

## Psod-Expressionseinheiten

### Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthal-
- 10 tend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

- 15 Verschiedene biosynthetische Produkte, wie beispielsweise Feinchemikalien, wie unter anderem Aminosäuren, Vitamine aber auch Proteine werden über natürliche Stoffwechselprozesse in Zellen hergestellt und werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik-, Feed-, Food- und pharmazeutischen Industrie. Diese Substanzen, die zusammen als Feinchemika-
- 20 lien/Proteine bezeichnet werden, umfassen unter anderem organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, sowie Proteine und Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am zweckmäßigsten im Großmaßstab mittels Anzucht von Bakterien, die entwickelt wurden, um große Mengen der jeweils gewünschten Substanz zu produzieren und sezernieren. Für die-
- 25 sen Zweck besonders geeignete Organismen sind coryneforme Bakterien, gram-positive nicht-pathogene Bakterien.

- Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der
- 30 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchroma-
- 35 tographie aber auch Sprühtrocknung, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

- Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von Feinchemikalien/Proteine produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Gene amplifiziert und die Auswirkung auf
- 40 die Produktion von Feinchemikalien/Proteine untersucht.

- Andere Wege, um ein Verfahren für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu entwickeln, oder die Produktivität eines bereits existierenden Verfahrens für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu erhöhen bzw. zu verbessern, sind die Expression eines oder mehrerer Gene zu erhöhen bzw. zu verändern und oder die Translation einer mRNA durch geeignete Polynukleotidsequenzen zu beeinflussen. Beeinflussung kann in diesem Zusammenhang die Erhöhung, Verringerung, oder auch andere Parameter der Expression von Genen wie zeitliche Expressionsmuster umfassen.
- Dem Fachmann sind unterschiedliche Bestandteile von bakteriellen Regulationssequenzen bekannt. Man unterscheidet die Bindungstellen von Regulatoren, auch Operatoren genannt, die Bindungstellen von RNA-Polymerase-Holoenzymen, auch -35 und -10 Regionen genannt, und die Bindungsstelle von Ribosomaler 16S-RNA, auch Ribosomale Bindungsstelle oder auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt.
- Als Sequenz einer Ribosomalen Bindungsstelle, auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt, im Sinne dieser Erfindung werden Polynukleotidsequenzen verstanden, die sich bis zu 20 Basen stromauf des Initiationskodons der Translation befinden.
- In der Literatur (*E. coli* und *S. typhimurium*, Neidhardt F.C. 1995 ASM Press) wird beschrieben, dass sowohl die Zusammensetzung der Polynukleotidsequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz, die Sequenzabfolge der Basen, aber auch der Abstand einer in der Shine-Dalgarno-Sequenz enthaltenen Polynukleotidsequenz zum einen wesentlichen Einfluss auf die Initiationsrate der Translation hat.
- Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität können die Bildung von mRNA auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Promotoren, deren Aktivität unabhängig von der physiologischen Wachstumsphase des Organismus sind, nennt man konstitutiv. Wiederum andere Promotoren reagieren auf externe chemische, wie physikalische Stimuli wie Sauerstoff, Metabolite, Hitze, pH, etc.. Wiederum andere zeigen in unterschiedlichen Wachstumsphasen eine starke Abhängigkeit ihrer Aktivität. Beispielsweise sind in der Literatur Promotoren beschrieben, die während der exponentiellen Wachstumsphase von Mikroorganismen eine besonders ausgeprägte Aktivität zeigen, oder aber auch genau in der stationären Phase des mikrobiellen Wachstums. Beide Charakteristika von Promotoren können für eine Produktion von Feinchemikalien und Proteine je nach Stoffwechselweg einen günstigen Einfluss auf die Produktivität haben.
- Zum Beispiel kann man Promotoren die während des Wachstums die Expression eines Gens ausschalten, diese aber nach einem optimalen Wachstum anschalten dazu nutzen, ein Gen zu regulieren, das die Produktion eines Metaboliten kontrolliert. Der

veränderte Stamm weist dann die gleichen Wachstumsparameter wie der Ausgangsstamm auf, produziert aber mehr Produkt pro Zelle. Diese Art der Modifizierung kann sowohl den Titer (g Produkt/Liter) als auch die C-Ausbeute (g Produkt/g-C-Quelle) erhöhen.

5

In *Corynebacterium* Spezies konnten bereits solche Nukleotidsequenzen isoliert werden, die für eine Erhöhung bzw. eine Abschwächung der Genexpression genutzt werden können. Diese regulierten Promotoren können die Rate, mit der ein Gen transkribiert wird, abhängig von den internen und/oder externen Bedingungen der Zelle erhöhen oder erniedrigen. Zum Teil kann die Anwesenheit eines bestimmten Faktors, bekannt als Inducer, die Rate der Transkription vom Promotor stimulieren. Inducer können direkt oder aber indirekt die Transkription vom Promotor beeinflussen. Eine andere Klasse von Faktoren, bekannt als Suppressoren ist in der Lage, die Transkription vom Promotor zu reduzieren oder aber zu inhibieren. Wie auch die Inducer, können auch die Suppressoren direkt oder indirekt wirken. Es sind jedoch auch Promotoren bekannt, die über die Temperatur reguliert werden. So kann der Level der Transkription solcher Promotoren zum Beispiel durch eine Erhöhung der Wachstumstemperatur über die normale Wachstumstemperatur der Zelle erhöht oder aber abgeschwächt werden.

10

15

Eine geringe Anzahl von Promotoren aus *C. glutamicum* wurden bis zum heutigen Tag beschrieben. Der Promotor des Malatsynthase-Gens aus *C. glutamicum* wurde im DE 4440118 beschrieben. Dieser Promotor wurde einem für ein Protein kodierenden Strukturgen vorgeschaltet. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneform-Bakterium wird die Expression des dem Promotor nachgeschalteten Strukturgens reguliert. Die Expression des Strukturgens wird induziert sobald dem Medium ein entsprechender Induktor zugesetzt wird.

25

Reinscheid et al., Microbiology 145:503 (1999) haben eine transkriptionelle Fusion zwischen dem pta-ack Promotor aus *C. glutamicum* und einem Reportergen (Chloramphenicol Acetyltransferase) beschrieben. Zellen von *C. glutamicum*, die eine solche transkriptionelle Fusion enthalten, wiesen eine erhöhte Expression des Reportergenes bei Wachstum auf Acetat haltigem Medium auf. Im Vergleich dazu zeigten transformierte Zellen, die auf Glucose wuchsen, keine erhöhte Expression dieses Reportergens.

30

35

In Pa'tek et al., Microbiology 142:1297 (1996) wurden einige DNA Sequenzen aus *C. glutamicum* beschrieben, die die Expression eines Reportergens in *C. glutamicum* Zellen verstärken können, beschrieben. Diese Sequenzen wurden miteinander verglichen, um Consensus-Sequenzen für *C. glutamicum* Promotoren zu definieren.

40

Weitere DNA-Sequenzen aus *C. glutamicum*, die zur Regulation der Genexpression genutzt werden können, sind im Patent WO 02/40679 beschrieben worden. Diese isolierten Polynukleotide stellen Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* dar, die entweder zur Erhöhung oder aber zur Verringerung einer Genexpression genutzt werden können. Weiterhin sind in diesem Patent rekombinante Plasmide beschrieben, auf denen die Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* mit heterologen Genen assoziiert sind. Die hier beschriebene Methode, Fusion von einem Promotor aus *Corynebakterium glutamicum* mit einem heterologen Gen, kann unter anderem zur Regulation der Gene der Aminosäurebiosynthese eingesetzt werden.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde weitere Promotoren und/oder Expressionseinheiten mit vorteilhaften Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

Demgemäß wurde gefunden, dass man Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

zur Transkription von Genen verwenden kann.

Unter „Transkription“ wird erfindungsgemäß der Prozess verstanden, durch den ausgehend von einer DNA-Matrize ein komplementäres RNA-Molekül hergestellt wird. An diesem Prozess sind Proteine wie die RNA-Polymerase sogenannte Sigma-Faktoren und transkriptionelle Regulatorproteine beteiligt. Die synthetisierte RNA dient dann als Matrize im Prozess der Translation, der dann zum biosynthetisch aktiven Protein führt.

Die Bildungsrate, mit der ein biosynthetisch aktives Protein hergestellt wird, ist ein Produkt aus der Rate der Transkription und der Translation. Beide Raten können erfindungsgemäß beeinflusst werden und damit die Rate der Bildung von Produkten in einem Mikroorganismus beeinflussen.

Unter einem „Promotor“ oder einer „Nukleinsäure mit Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu transkribierenden Nukleinsäure, die Transkription dieser Nukleinsäure reguliert.

- 5 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und einer zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel Nukleinsäuresequenzen, die die Transkription von Nukleinsäuren gewährleisten, sowie zum Beispiel einen Terminator
- 10 derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Transkription der der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevor-
- 15 zugt sind Anordnungen, in denen die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Promotorsequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als
- 20 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Unter „Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA, also die Transkriptionsrate verstanden.

- 25 Unter „spezifischer Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA pro Promotor verstanden.

Unter dem Begriff „Wildtyp“ wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsmikroorganismus verstanden.

30

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff „Mikroorganismus“ der Ausgangsmikroorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Mikroorganismus oder beides verstanden werden.

- 35 Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Mikroorganismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter „Wildtyp“ für die Veränderung oder Verursachung der Promotoraktivität oder Transkriptionsrate, für die Veränderung oder Verursachung der Expressionsaktivität oder Expressionsrate und für die Erhöhung des Gehalts an biosynthetischen Produkten jeweils ein Referenzorganismus

verstanden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser Referenzorganismus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Ausgangsmikroorganismen verwendet die bereits in der Lage sind, die gewünschte Feinchemikalie herzustellen. Besonders bevorzugt sind dabei unter den besonders bevorzugten Mikroorganismen der Bakterien der Gattung *Corynebacterien* und den besonders bevorzugten Feinchemikalien L-  
10 Lysin, L-Methionin und L-Threonin, diejenigen Ausgangsmikroorganismen die bereits in der Lage sind, L-Lysin, L-Methionin und/oder L-Threonin herzustellen. Dies sind besonderes bevorzugt *Corynebakterien* bei denen beispielsweise das Gen kodierend für eine Aspartokinase (ask-Gen) dereguliert ist oder die feed-back-Inhibierung aufgehoben oder reduziert ist. Beispielsweise weisen solche Bakterien im ask-Gen eine Mutation  
15 auf, die zu einer Reduzierung oder Aufhebung der feed-back-Inhibierung führen, wie beispielsweise die Mutation T311I.

Bei einer „verursachten Promotoraktivität“ oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung einer  
20 RNA verursacht, die im Wildtyp so nicht vorhanden war.

Bei einer veränderten Promotoraktivität oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge der RNA verändert.

25

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Promotoraktivität des endogenen erfindungsgemäßen Promotors, beispielsweise durch Mutation des Promotors oder durch Stimulierung oder Hemmung des Promotors erfolgen.

30

Weiterhin kann die erhöhte Promotoraktivität oder Transkriptionsrate beispielsweise durch Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität erreicht werden, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

35

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäu-  
40

ren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität dadurch erreicht, dass man

5 eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthalten

- 20 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder  
B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist  
oder  
25 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder  
D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

30 Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die Promotorsequenz der Superoxid-Dismutase (Psod) aus *Corynebakterium glutamicum* dar. SEQ. ID. NO. 1 entspricht der Promotorsequenz des Wildtyps.

35 Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist.

40 Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Promotoren lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Daten-

banken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 1 leicht auffinden.

Künstliche erfindungsgemäße Promotor-Sequenzen lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Nukleotide durch ein oder mehrere Nukleotide zu verstehen. „Deletion“ ist das Ersetzen eines Nukleotides durch eine direkte Bindung. Insertionen sind Einfügungen von Nukleotiden in die Nukleinsäuresequenz, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Nukleotide ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleotide über die jeweils gesamte Nukleinsäurelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

- 20 Multiple alignment parameter:
  - Gap opening penalty 10
  - Gap extension penalty 10
  - Gap separation penalty range 8
  - Gap separation penalty off
- 25 % identity for alignment delay 40
  - Residue specific gaps off
  - Hydrophilic residue gap off
  - Transition weighing 0
- 30 Pairwise alignment parameter:
  - FAST algorithm on
  - K-tuplesize 1
  - Gap penalty 3
  - Window size 5
- 35 Number of best diagonals 5

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, ins-

besondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 90 % aufweist.

- 5      Besonders bevorzugte Promotoren weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

- 10     Weitere natürliche Beispiele für Promotoren lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- 15     Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

- 20     Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

- 25     Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (pH 7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.
- 30

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität, Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische Promotoraktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

- 35     Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Promotoraktivität verstanden die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevorzugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Promotoraktivität der Ausgangssequenz aufweist:

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform A), B) oder C) beschriebenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität verstanden. Vorzugweise weisen diese Fragmente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugts mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz  
5 SEQ. ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 als Promotor, d.h. zur Transkription von Genen.

10 Die SEQ. ID. NO. 1 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 beschrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend  
15

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist  
20 oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

Alle vorstehend erwähnten Nukleinsäuren mit Promotoraktivität sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie  
30 beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory  
35 manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine  
40 der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell

verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.

5 Unter einer Expressionseinheit wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure mit Expressionsaktivität verstanden, also eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu exprimierenden Nukleinsäure oder Gens, die Expression, also die Transkription und die Translation dieser Nukleinsäure oder dieses Gens reguliert.

10 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Expressionseinheit und einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne  
15 erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Expressionseinheitssequenz positioniert wird, so dass beide  
20 Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Expressionseinheitssequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

25 Unter „Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein, also die Expressionsrate verstanden.

Unter „spezifischer Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein pro Expressionseinheit ver-  
30 standen.

Bei einer „verursachten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung eines Proteins verursacht, das im Wildtyp so nicht vorhanden war.

35 Bei einer „veränderten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge des Proteins verändert.

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

- 5 Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität der endogenen Expressionseinheit, beispielsweise durch Mutation der Expressionseinheit oder durch Stimulierung oder Hemmung der Expressionseinheit erfolgen.

- 10 Weiterhin kann die erhöhte Expressionsaktivität oder Expressionsrate beispielsweise durch Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität erreicht werden, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

- 15 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität dadurch erreicht, dass man

- 20 eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 25 ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 30 ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 35 Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, enthalten eine erfindungsgemäße, vorstehend beschriebene Nukleinsäure mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Vorzugsweise enthält diese Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 42 als ribosomale Bindungsstelle.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Expressionseinheit:

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- 10 F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).

15

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Nukleinsäuresequenz der Expressionseinheit der Superoxid-Dismutase (Psod) aus *Corynebakterium glutamicum* dar. SEQ. ID. NO. 2 entspricht der Sequenz der Expressionseinheit des Wildtyps.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionseinheiten, enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25 Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

30

Künstliche erfindungsgemäße Sequenzen der Expressionseinheiten lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

35

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität

40 von mindestens 90 % aufweist.

Besonders bevorzugte Expressionseinheiten weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

5

Weitere natürliche Beispiele für Expressionseinheiten lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressionseinheiten, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

15

Unter "hybridisieren" versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze.

20

Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

25

Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (pH 7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

30

Die erfindungsgemäß Nukleotidsequenzen ermöglichen ferner die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Mikroorganismen verwendbar sind. Solche Sonden

35

40

bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringen-  
ten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B.  
etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfin-  
dungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges  
5 hybridisiert.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte  
stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen  
Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz  
10 verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten  
oder Allelvarianten, davon.

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Expressionseinheiten,  
Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische  
15 Expressionsaktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Expressionsaktivität verstanden  
die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevor-  
zugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Expressionsaktivität der Aus-  
gangssequenz aufweist.  
20

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform E), F) oder G)  
beschriebenen Expressionseinheiten verstanden. Vorzugsweise weisen diese Frag-  
mente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevor-  
zugt mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz SEQ.  
25 ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 als  
Expressionseinheit, d.h. zur Expression von Genen.  
30

Die SEQ. ID. NO. 2 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 be-  
schrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen  
Expressionseinheiten.

35 Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend eine erfin-  
dungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität zusätzlich funktionell verknüpft eine  
Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend  
40

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- 5 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenommen ist.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten umfassen ein oder mehrere der folgenden genetischen Elemente: eine Minus 10 (" -10") Sequenz; eine Minus 35 (" -35") Sequenz; einen Transkriptionsstart, eine Enhancer Region; und eine Operator Region.

Vorzugsweise sind diese genetischen Elemente spezifisch für die Spezies *Corynebakterien*, speziell für *Corynebacterium glutamicum*.

Alle vorstehend erwähnten Expressionseinheiten sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Für die Erfindungen in diesem Patent wurden Methoden und Techniken genutzt, die dem Fachmann, der in mikrobiologischen und rekombinanten DNA-Techniken geübt ist, bekannt sind. Methoden und Techniken für das Wachstum von Bakterienzellen, das Einschleusen von isolierten DNA-Molekülen in die Wirtszelle, und die Isolierung, Klonierung und Sequenzierung von isolierten Nukleinsäuremolekülen usw. sind Beispiele für solche Techniken und Methoden. Diese Methoden sind in vielen Standardliteraturstellen beschrieben: Davis et al., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986); J. H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer and P. Berg, *Genes & Genomes*, University Science Books, Mill Valley, California

(1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann et al., Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); and P.F. Smith-Keary, Molecular Genetics of Escherichia coli, The Guilford Press, New York, NY (1989).

10 Alle Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung liegen bevorzugt in Form eines isolierten Nukleinsäuremoleküls vor. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch  
15 synthetisiert wird.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

20 Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise besonders vorteilhaft in verbesserten Verfahren zur fermentativen Herstellung von biosynthetischen Produkten wie nachstehend beschrieben verwenden.

Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten weisen insbesondere den Vorteil auf, dass sie in Mikroorganismen durch Stress induziert werden. Durch geeignete Steuerung des Fermentationsprozesses lässt sich diese Stress-Induktion gezielt für eine Erhöhung der Transkriptions/Expressionsrate gewünschter Gene steuern. Insbesondere bei der Produktion von L-Lysin wird diese Stressphase sehr früh erreicht, so dass hier sehr früh eine erhöhte Transkriptions/Expressionsrate  
30 von gewünschten Genen erreicht werden kann.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

35 Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zur Regulation und Verstärkung der Bildung von verschiedenen biosynthetischen Produkten, wie beispielsweise Feinchemikalien, Proteinen, insbesondere Aminosäuren, in Mikroorganismen, insbesondere in *Corynebacterium species* dienen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 10 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 15 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform a) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Promotoraktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Eine erhöhte bzw. erniedrigte Promotoraktivität kann dadurch erreicht werden, dass Nukleotide in der Bindungsstelle des RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen (dem Fachmann auch als -10-Region und -35 Region bekannt) ausgetauscht werden. Weiterhin dadurch dass der Abstand der beschriebenen RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen zueinander durch Deletionen von Nukleotiden oder Insertionen von Nukleotiden verkleinert oder vergrößert werden. Weiterhin dadurch dass Bindungsstellen (dem Fachmann auch als -Operatoren bekannt) für Regulationsproteine (dem Fachmann bekannt als Repressoren und Aktivatoren) in räumliche Nähe an die Bindungsstellen des RNA-Polymerase-Holoenzym gebracht werden, dass diese Regulatoren nach Bindung an eine Promotor-Sequenz die Bindung des und Transkriptionsaktivität des RNA-Polymerase-Holoenzym abschwächen oder verstärken, oder auch unter einen neuen regulatorischen Einfluss stellen.

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 stellt vorzugsweise die ribosomale Bindungsstelle der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die Sequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 die -10-Region der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten dar.

Veränderungen der Nukleinsäuresequenz in diesen Regionen führen zu einer Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. als ribosomale Bindungsstelle verwendet.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43. Vorzugsweise wird dabei eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region verwendet.

In Bezug auf die „spezifische Promotoraktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 1 verstanden.

Gemäß Ausführungsform b) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promo-

toraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

5        b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10       b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

15       Es ist somit möglich, die Transkriptionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

20       gemäß Ausführungsform b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25       gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere endogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, endogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30       Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende endogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35       Ferner ist es somit möglich, die Transkriptionsrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

40       gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, exogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Pro-

motoraktivität, erfolgt oder

5 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

10 Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform b2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

15 Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform b3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal. Eine „chromosomale“ Integration ist die Insertion eines exogenen DNA-Fragmentes in das Chromosom einer Wirtszelle. Dieser Begriff wird auch für die homologe Rekombination zwischen einem exogenen DNA-Fragment und der entsprechenden Region auf dem Chromosom der Wirtszelle genutzt.

20 In Ausführungsform b) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform b), wie in Ausführungsform a) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

25 Unter „endogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die bereits im Wildtypgenom enthalten sind.

Unter „exogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die im Wildtypgenom nicht enthalten sind.

30 Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf Regulation der Transkription durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen zu transkribierenden Bereich, also beispielsweise einen Bereich der die Translation reguliert, einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls  
35 weitere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf die nachstehend beschriebene Regulation der Expression durch die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls wei-

tere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter einem „kodierenden Bereich“ wird eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die ein Protein kodiert.

5

Unter „heterolog“ in Bezug auf Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität transkribiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Nukleinsäure mit Promotoraktivität und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

10

Unter „heterolog“ in Bezug auf Expressionseinheiten und Gene wird verstanden, dass die verwendeten Gene im Wildtyp nicht unter Regulation der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten exprimiert werden, sondern dass eine neue, im Wildtyp nicht vorkommende funktionelle Verknüpfung entsteht und die funktionelle Kombination aus erfindungsgemäßer Expressionseinheit und spezifisches Gen im Wildtyp nicht vorkommt.

15

Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

20

ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

25

bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

30

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) dadurch erreicht wird, dass man

35

bh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer en-

40

dogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 5 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 10 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man
- 20 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder
- 25 br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.
- Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch
- 30 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 35 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform c) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Expressionsaktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Beispielsweise führt die Verlängerung des Abstandes zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und dem translationellen Startcodon in der Regel zu einer Änderung, einer Verkleinerung oder aber auch einer Verstärkung der spezifischen Expressionsaktivität. Eine Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität kann auch dadurch erreicht werden, dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region (Ribosomale Bindungsstelle) in seinem Abstand zum translationellen Startcodon durch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden entweder verkürzt oder verlängert wird. Aber auch dadurch dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region so verändert wird, dass die Homologie zu komplementären 3' Seite 16S rRNA entweder verstärkt oder aber auch verringert wird.

In Bezug auf die „spezifische Expressionsaktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Expressionseinheit des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 2 verstanden.

Gemäß Ausführungsform d) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

- d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder
- d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

Es ist somit möglich, die Expressionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

gemäß Ausführungsform d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Ferner ist es somit möglich, die Expressionssrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende, exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform d2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

40

Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform d3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal.

- 5 Die Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch als Expressionskassetten bezeichnet.

10 In Ausführungsform d) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform d), wie in Ausführungsform d) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

20 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

25 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

30 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) dadurch erreicht, dass man

35 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

40 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenen-

falls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

- cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder
- 15 dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von

30 proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren

35 kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gege-

benenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

In einer besondere bevorzugten Ausführungsform sind die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe

- 5
- Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin
- 10
- Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-
- 15
- Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

Bevorzugte Proteine und Nukleinsäuren kodierend diese Proteine der vorstehend beschriebenen Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind Proteinsequenzen bzw. Nukleinsäuresequenzen mikrobiellen Ursprungs, vorzugsweise aus Bakterien der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, bevorzugt aus coryneformen Bakterien, besonders bevorzugt aus Corynebacterium glutamicum.

Beispiele für besonders bevorzugte Proteinsequenzen und die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, deren Bezugsdokument, sowie deren Bezeichnung im Bezugsdokument sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1

Protein	Nukleinsäure kodierend	Bezugs- dokument	SEQ. ID. NO. im Bezugsdoku-
---------	---------------------------	---------------------	--------------------------------

	Protein		ment
Aspartatkinase	ask oder lysC	EP1108790	DNA: 281 Protein: 3781
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	asd	EP1108790	DNA: 331 Protein: 3831
Dihydrodipicolinate-Synthetase	dapA	WO 0100843	DNA: 55 Protein: 56
Dihydrodipicolinate-Reduktase	dapB	WO 0100843	DNA: 35 Protein: 36
Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Protein : 6944
Diaminopicolinat-Decarboxylase	lysA	EP1108790	DNA: 3451 Prot.:6951
Lysin-Exporter	lysE	EP1108790	DNA: 3455 Prot.: 6955
Arginyl-t-RNA Synthetase	argS	EP1108790	DNA: 3450 Prot.: 6950
Glucose-6-Phosphat-Dehydrognease	zwf	WO 0100844	DNA: 243 Prot.: 244
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	gap	WO 0100844	DNA: 187 Prot.: 188
3-Phosphoglycerat-kinase	pgk	WO 0100844	DNA: 69 Prot.: 70
Pyruvat-Carboxylase	pycA	EP1108790	DNA: 765 Prot.: 4265
Triosephosphat-Isomerase	tpi	WO 0100844	DNA: 61 Prot.: 62
Biotin-Ligase	birA	EP1108790	DNA: 786 Prot.: 4286
PEP-Carboxylase	pck	EP1108790	DNA: 3470 Prot.: 6970
Homoserin Kinase	thrB	WO 0100843	DNA: 173 Prot.: 174
Threonin Synthase	thrC	WO 0100843	DNA: 175 Prot.: 176
Threonin Export Carrier	thrE	WO 0251231	DNA: 41

			Prot.: 42
Threonin Efflux Protein	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 Prot.: 8
Threonin Dehydratase	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 Prot.: 5828
Homoserin-O-Acetyltransferase	metA	EP 1108790	DNA: 727 Prot.: 4227
Cystathionin-gamma-synthase	metB	EP 1108790	DNA: 3491 Prot.: 6991
Cystathionin-beta-Lyase	metC	EP 1108790	DNA: 2535 Prot.: 6035
Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, -	metH	EP 1108790	DNA: 1663 Prot.: 5163
O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase	metY	EP 1108790	DNA: 726 Prot.: 4226
Methylentetrahydrofolat-Reduktase	metF	EP 1108790	DNA: 2379 Prot.: 5879
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	serA	EP 1108790	DNA: 1415 Prot.: 4915
Phosphoserin-Phosphatase 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 Prot.: 154
Phosphoserin-Phosphatase 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 Prot.: 3967
Phosphoserin-Phosphatase 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 Prot.: 3834
Phosphoserin-Aminotransferase	serC	WO 0100843	DNA: 151 Prot.: 152
Serin Acetyl-Transferase	cysE	WO 0100843	DNA: 243 Prot.: 244
Cystein-Synthase I	cysK	EP 1108790	DNA: 2817 Prot.: 6317
Cystein Synthase II	CysM	EP 1108790	DNA: 2338 Prot.: 5838
Homoserin-Dehydrogenase	hom	EP 1108790	DNA: 3452 Prot.: 6952
Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase	metE	WO 0100843	DNA: 755 Prot.: 756

Serin-Hydroxymethyltransferase	glyA	WO 0100843	DNA: 143 Prot.: 144
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 Prot.: 6589
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1	CysN	EP 1108790	DNA: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 2	CysD	EP 1108790	DNA: 3093 Prot.: 6593
Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase	CysH	WO 02729029	DNA: 7 Prot.: 8
Ferredoxin-Sulfit-Reduktase	RXA073	WO 0100842	DNA: 329 Prot.: 330
Ferredoxin NADP Reduktase	RXA076	WO 0100843	DNA: 79 Prot.: 80
Transkriptioneller Regulator LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 Protein: 298
Transkriptioneller Regulator LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 Protein: 4176
Transkriptioneller Regulator LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 Protein: 6728
Transkriptioneller Regulator LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 Protein: 5700
Malat-Quinon-Oxodoreduktase	mgo	WO 0100844	DNA: 569 Protein: 570
Transketolase	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 Prot: 5240
Transaldolase	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 Prot: 246
OPCA	opcA	WO 0100804	DNA: 79 Prot: 80
1-Phosphofructokinase 1	pfk1	WO0100844	DNA: 55 Protein: 56
1-Phosphofructokinase 2	pfk2	WO0100844	DNA: 57 Protein: 58
6-Phosphofructokinase 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383 Protein: 4883

6-Phosphofructokinase 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 Protein: 2
Fructose-1,6- biphosphatase 1	fbr1	EP1108790	DNA: 1136 Protein: 4636
Pyruvat Oxidase	poxB	WO 0100844	DNA : 85 Protein: 86
RXA00655-Regulator	RXA655	US2003162267 .2	DNA: 1 Prot.: 2
RXN02910-Regulator	RXN2910	US2003162267 .2	DNA: 5 Prot.: 6
6- phosphogluconolacto- nase	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 Prot.: 2

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz der Fructose-1,6-bisphosphatase 2, oder auch fbr2 ge-  
 5 nannt, (SEQ. ID. NO. 41) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend eine Fructose-1,6-bisphosphatase 2 (SEQ. ID. NO. 40).

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz des Proteins in Sulfat-Reduktion, oder auch RXA077  
 10 genannt, (SEQ. ID. NO. 4) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend ein Protein in Sulfat-Reduktion (SEQ. ID. NO. 3)

Weitere besonders bevorzugte Proteinsequenzen aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, weisen jeweils die in Tabelle 1 für dieses Protein angegebene Aminosäuresequenz auf, wobei das jeweilige Protein jeweils an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte2 für diese Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäurepositionen eine andere proteinogene Aminosäure aufweist als die jeweilige in Tabelle2/Spalte3 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform,  
 15 weisen die Proteine an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte 2 für die Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäureposition die in Tabelle2/Spalte4 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure auf. Es handelt sich bei den in Tabelle 2 angegebenen Proteine um mutierte Proteine des Biosyntheseweges von Aminosäuren, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen und sich deshalb insbesondere zur Expres-  
 20 sion der entsprechenden Nukleinsäuren durch den erfindungsgemäßen Promotor und zur Herstellung von Aminosäuren eignen. Beispielsweise führt die Mutation T311I zu

einem Ausschalten der feedback-Inhibierung von ask.

Die entsprechenden Nukleinsäuren, die ein vorstehend beschriebenes mutiertes Protein aus Tabelle 2 kodieren, lassen sich durch übliche verfahren herstellen.

5

Als Ausgangspunkt zur Herstellung der Nukleinsäuresequenzen kodierend ein mutiertes Protein eignet sich beispielsweise das Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist oder die in Tabelle 1 in Bezug genommenen Nukleinsäuresequenzen. Für die Rückübersetzung der Aminosäuresequenz der mutierten Proteine in die Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine ist es vorteilhaft, die codon usage desjenigen Organismus zu verwenden, in den die Nukleinsäuresequenz eingebracht werden soll oder in der die Nukleinsäuresequenz vorliegt. Beispielsweise ist es vorteilhaft für *Corynebakterium glutamicum* die codon usage von *Corynebakterium glutamicum* zu verwenden. Die codon usage des jeweiligen Organismus lässt sich in an sich bekannter Weise aus Datenbanken oder Patentanmeldungen ermitteln, die zumindest ein Protein und ein Gen, das dieses Protein kodiert, aus dem gewünschten Organismus beschreiben.

20 Die Angaben in Tabelle 2 sind folgendermassen zu verstehen:

In Spalte 1 "Identifikation" wird eine eindeutige Bezeichnung für jede Sequenz in Bezug auf Tabelle 1 aufgeführt.

25 In Spalte 2 "AS-POS" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die Aminosäureposition der entsprechenden Polypeptidsequenz aus Tabelle 1. Eine "26" in der Spalte "AS-POS" bedeutet demzufolge die Aminosäureposition 26 der entsprechend angegebenen Polypeptidsequenz. Die Zählung der Position beginnt N-Terminal bei +1.

30 In Spalte 3 "AS-Wildtyp" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Wildtyp-Stamm der Sequenz aus Tabelle 1.

35 In Spalte 4 "AS-Mutante" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Mutanten-Stamm.

In Spalte 5 "Funktion" wird die physiologische Funktion der entsprechenden Polypeptidsequenz aufgeführt.

40

Für ein mutiertes Protein mit einer bestimmten Funktion (Spalte 5) und einer bestimmten Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1) werden in den Spalten 2,3 und 4 mindestens eine Mutation, bei einigen Sequenzen auch mehrere Mutationen beschrieben. Diese mehreren Mutationen beziehen sich immer auf die jeweils  
 5 obenstehende, nächstliegende Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1). Unter dem Begriff „mindestens eine der Aminosäurepositionen“ einer bestimmten Aminosäuresequenz wird vorzugsweise mindestens eine der für diese Aminosäuresequenz in Spalte 2, 3 und 4 beschriebenen Mutationen verstanden.

10 Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

- A Alanin
- C Cystein
- D Aspartat
- 15 E Glutamat
- F Phenylalanin
- G Glycin
- H His
- I Isoleucin
- 20 K Lysin
- L Leucin
- M Methionin
- N Asparagin
- P Prolin
- 25 Q Glutamin
- R Arginin
- S Serin
- T Threonin
- V Valin
- 30 W Tryptophan
- Y Tyrosin

Tabelle 2

Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5
Identifikation	AS Position	AS Wildtyp	AS Mutante	Funktion
ask	317	S	A	Aspartatkinase
	311	T	I	
	279	A	T	

asd	66	D	G	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihydrodipicolinat Synthetase
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihydrodipicolinat-Reduktase
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinat-Decarboxylase
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginyl-t-RNA-Synthetase
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
pycA	7	S	L	Pyruvat-Carboxylase
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	

	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-Carboxylase
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserin Kinase
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	Threonin Synthase
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	Threonin-Efflux Protein
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserin-Dehydrogenase
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	transkriptioneller Regulator LysR1
lysR3	142	R	W	transkriptioneller Regulator LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transketolase
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolase
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartat-1-Decarboxylase
	33	G	S	6- Phosphogluconolactonase

In den vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sowie den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Mikroorganismen, den nachstehend beschriebenen genetisch veränderten Mikroorganismen und den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten erfolgt das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, der vorstehend beschriebenen Gene und der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus, insbesondere in coryneforme Bakterien, vorzugsweise durch die SacB-Methode.

Die SacB-Methode ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Jul 22;145(1):69-73 und Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6):1447-57 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäßen Expressionseinheiten in den Mikroorganismus.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus.

Die Erfindung betrifft daher ferner eine Expressionskassette, umfassend

mindestens eine erfindungsgemäße Expressionseinheit

mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, also ein zu exprimierendes Gen und

gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente, wie beispielsweise einen Terminator,

5 wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

Vorzugsweise ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

10

Besonders bevorzugt ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen.

15

20

Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend und deren Beispiele in Tabelle 1 und 2 beschrieben.

25

In den erfindungsgemäßen Expressionskassetten ist die physikalische Lage der Expressionseinheit relativ zum zu exprimierenden Gen so gewählt, daß die Expressionseinheit die Transkription und vorzugsweise auch die Translation des zu exprimierenden Gens reguliert und damit die Bildung eines oder mehrerer Proteine ermöglicht. Die "Bildung ermöglichen" beinhaltet dabei die konstitutive Steigerung der Bildung, Abschwächung bzw. Blockierung der Bildung unter spezifischen Bedingungen und oder die Steigerung der Bildung unter spezifischen Bedingungen. Die "Bedingungen" umfassen dabei: (1) Zugabe einer Komponente zum Kulturmedium, (2) Entfernen einer Komponente vom Kulturmedium, (3) Austausch einer Komponente im Kulturmedium durch eine zweite Komponente, (4) Erhöhung der Temperatur des Kulturmediums, (5) Erniedrigung der Temperatur des Kulturmediums, und (6) Regulierung der atmosphärischen Bedingungen, wie z.B. die Sauerstoff- oder Stickstoffkonzentration, in der das Kulturmedium gehalten wird.

30

35

40

Die Erfindung betrifft ferner einen Expressionsvektor enthaltend eine vorstehend beschriebene, erfindungsgemäße Expressionskassette.

5 Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert  
10 werden.

Als Plasmide eignen sich solche besonders bevorzugt, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991))  
15 beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLiK5MCS, oder solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

20 Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert,  
25 der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/ Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio-  
30 technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptions-

rate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

- 5 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder
- 10 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 15 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man
- 20 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 25 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 30 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 35 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei
- 40 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Ge-

nen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

- 5 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

- 10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

- 15 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 20 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

- 25 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

- 30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

- 35 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

- 40 br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten

Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

- ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man
- 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei,
- 35 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder
- dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass
- 40 die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expres-

sionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

- 5 Ferner betrifft die Erfindung einen genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu exprimierendes Gen; wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

10 Besonders bevorzugt enthält dieser genetisch veränderte Mikroorganismus eine erfindungsgemäße Expressionskassette.

Besonders bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung genetisch veränderte Mikroorganismen, insbesondere coryneforme Bakterien, die einen Vektor, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, der wenigstens ein rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt erfindungsgemäßer Definition trägt, enthalten.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

35 Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-  
40 Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkrip-

tioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller  
 Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase,  
 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-  
 Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-  
 5 Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-  
 Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-  
 Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-  
 Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyru-  
 vat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II  
 10 Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-  
 Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin  
 Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase,  
 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Argi-  
 nyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Se-  
 15 rinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-  
 Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-  
 Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase

Besonders bevorzugte Beispiele der Proteine und Gene aus dem Biosyntheseweg von  
 20 Aminosäuren sind vorstehend in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschrieben.

Bevorzugte Mikroorganismen oder genetisch veränderte Mikroorganismen sind Bakte-  
 rien, Algen, Pilze oder Hefen.

25 Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind insbesondere coryneforme Bakterien.

Bevorzugte coryneforme Bakterien sind Bakterien der Gattung *Corynebacterium*, ins-  
 besondere der Arten *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutami-*  
*cum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Cory-*  
 30 *nebacterium melassecola* und *Corynebacterium efficiens* oder der Gattung *Brevibacte-*  
*rium*, insbesondere der Arten *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*  
 und *Brevibacterium divaricatum*.

Besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium*  
 35 sind ausgewählt aus der Gruppe *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Coryne-*  
*bacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC  
 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium me-*  
*lassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium effi-*  
*ciens* DSM 44548, *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Brevibacterium flavum*  
 40 ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Brevibacterium divarica-*

tum ATCC 14020, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

Mit der Abkürzung KFCC ist die Korean Federation of Culture Collection gemeint, mit  
5 der Abkürzung ATCC die American type strain culture collection, mit der Abkürzung  
DSM die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Weitere besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevi-*  
bacterium sind in Tabelle 3 aufgelistet:

10

Bakterium		Hinterlegungsnummer							
Genus	species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							
Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							

Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniagenes	6872						2399	
Corynebacterium	ammoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujiokense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							

Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							

Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

5 FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK

10 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baam, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

15 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und den erfindungsgemäßen Expressionseinheiten ist es mit Hilfe der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren möglich in den vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen die Stoffwechselwege zu spezifischen biosynthetischen Produkten zu regulieren.

20

Dazu werden beispielsweise Stoffwechselwege die zu einem spezifischen biosynthetischen Produkt führen durch Verursachung oder Erhöhung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses Biosyntheseweges verstärkt in dem die erhöhte Proteinmenge zu einer erhöhten Gesamtaktivität dieser Proteine des gewünschten Biosyntheseweges und damit zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

25

Weiterhin können Stoffwechselwege die von einem spezifischen biosynthetischen Produkt wegführen durch Reduzierung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses wegführenden Biosyntheseweges abgeschwächt werden in dem die reduzierte Proteinmenge zu einer reduzierten Gesamtaktivität dieser Proteine des unerwünschten Biosyntheseweges und damit zusätzlich zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

30

35 Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen sind beispielsweise in der Lage aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol biosynthetische Produkte herzustellen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganis-

40

men.

5 Je nach gewünschtem biosynthetischen Produkt muss die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate verschiedener Gene erhöht bzw. reduziert werden. In der Regel ist es vorteilhaft die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate mehrere Gene zu verändern, d.h. die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu Erhöhen und/oder die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu reduzieren.

10 In den erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen ist mindestens eine veränderte, dass heißt erhöhte oder reduzierte Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate eines Gens auf eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäße Expressionseinheit zurückzuführen.

15 Weitere, zusätzliche veränderte, d.h. zusätzlich erhöhte oder zusätzlich reduzierte Transkriptionsraten bzw. Expressionsraten von weiteren Genen im genetisch veränderten Mikroorganismus können, müssen aber nicht auf die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zurück gehen.

20 Die Erfindung betrifft deshalb weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganismen.

25 Bevorzugte biosynthetische Produkte sind Feinchemikalien.

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Verbindungen, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts-, Kosmetik, Food und Feed-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie beispielsweise Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propan-3,3'-diol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und

- Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und  
5 sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

10 I. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen

Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt,  
15 dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren  
20 gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthese- und Abbauwege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin,  
25 Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthese mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu syn-  
30 thetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen An-  
35 wendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie  
40 auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan

werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- $\beta$ -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glycolyse- und Pento- sephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea

Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-

5 Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-

Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Amino-

10 säure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

## II. Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika-Metabolismus sowie Verwendungen

Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen.

15 Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben

20 neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt

25 und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutrazeutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder

30 anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise organisch. Der Begriff "Nutrazeutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

35 Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and

40

Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

- 5 Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavin-mononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B6" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin,
- 10 Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxinhydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Panthothenat (Pantothersäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)- $\beta$ -alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Panthothenat-Biosynthese bestehen aus
- 15 der ATP-getriebenen Kondensation von  $\beta$ -Alanin und Pantothersäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantothersäure, in  $\beta$ -Alanin und zur Kondensation in Pantothersäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Panthothenat ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Panthothenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von
- 20 Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht nur die Bildung von Panthothenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantothersäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B<sub>5</sub>), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

- Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehören. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des
- 30  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoessäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p-
- 35 Aminobenzoessäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden.

- Corrinoide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B<sub>12</sub>) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B<sub>12</sub> ist hinreichend komplex, daß sie noch
- 40 nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der betei-

ligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

5

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B<sub>6</sub>, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B<sub>12</sub> wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

10

### III. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

15 Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, läßt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen.

20

25

Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.

30

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflusst wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressionsmittel oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin-

35

40

und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden gewöhnlich als

5 Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den Pflanzenschutz,

10 einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular biology, Bd. 42,

15 Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; Kap. 8 in : Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide

20 werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP) führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für

25 viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschnitt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukle-

30 otides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

#### *IV. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen*

35 Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über  $\alpha,\alpha$ -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610;

40 Singer, M.A. und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. und

Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M. J. Japan 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

5

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind ausgewählt aus der Gruppe organische Säuren, Proteine, Nukleotide und Nukleoside, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Lipide und Fettsäuren, Diöle, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, Enzyme und Proteine.

10

Bevorzugte organische Säuren sind Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure

Bevorzugte Nukleoside und Nukleotide sind beispielsweise beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6,

15

Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten.

Bevorzugte biosynthetische Produkte sind weiterhin Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure, Diöle wie beispielsweise Propandiol und Butandiol, Kohlenhydrate, wie beispielsweise Hyaluronsäure und Trehalose, aromatische Verbindungen, wie beispielsweise aromatische Amine, Vanillin und Indigo, Vitamine und Cofaktoren, wie beispielsweise beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme Polyketide (Cane et al. (1998) *Science* 282: 63-68), und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien.

30

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind Aminosäuren, besonders bevorzugt essentielle Aminosäuren, insbesondere L-Glycin, L-Alanin, L-Ileucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Serin, L-Prolin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Cystein, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure und L-Threonin, L-Homoserin, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin. Im folgenden wird unter einer Aminosäure, wie beispielsweise Lysin, Methionin und Threonin, sowohl jeweils die L- und die D-Form der Aminosäure, vorzugsweise die L-Form, also beispielsweise L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin verstanden.

40

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

- 5 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 10 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,
- und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine
- 15 Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-
- 20 Oxodoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase.
- 25
- 30
- 35 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man
- 40 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus ein-

bringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 10 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 15 Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
- 20 Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität
- 25 des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität,
- 30 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.

- Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-
- 35

Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

5 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

15 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

20 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-  
25 Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-  
30 Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität  
35 II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren  
40 kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine

Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend eine, RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.

5

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

10

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

15

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

25

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Homoserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serine Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase-Aktivität, Cystein-Synthase II -Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-

30

35

40

Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und  
5 Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.  
10

15 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

20 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

25 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,  
30

und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren  
35  
40

kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Op-  
cA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Dehydrogenase

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketola-

se-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität, Ketol-Aid-Reductoisomerase-Aktivität, Branched chain aminotransferase-Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

Unter dem Begriff der „Aktivität“ eines Proteins wird bei Enzymen die Enzymaktivität des entsprechenden Proteins, bei anderen Proteinen, beispielsweise Struktur oder Transport-Proteinen die physiologische Aktivität der Proteine verstanden.

Die Enzyme sind in der Regel in der Lage ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln bzw. diesen Umwandlungsschritt zu katalysieren.

Dementsprechend wird unter der „Aktivität“ eines Enzyms die in einer bestimmten Zeit durch das Enzym umgesetzte Menge Substrat bzw. gebildete Menge Produkt verstanden.

Bei einer erhöhten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat

bzw. die gebildete Menge Produkt erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der „Aktivität“ bei allen vorstehend und nachstehend beschriebenen Aktivitäten mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der „Aktivität des Wildtyps“.

Bei einer reduzierten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat bzw. die gebildete Menge Produkt reduziert.

Unter einer reduzierten Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität dieses Enzyms in einem Mikroorganismus verstanden.

Eine Reduzierung der Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Enzyms bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Enzyms (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des Enzyms). Vorzugsweise wird die Aktivität im Mikroorganismus im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint „Reduzierung“ auch das vollständige Fehlen der entsprechenden Aktivität.

Die Aktivität bestimmter Enzyme in genetisch veränderten Mikroorganismen sowie im Wildtyp und damit die Erhöhung oder Reduzierung der Enzymaktivität lassen sich nach bekannten Verfahren, wie beispielsweise Enzymassays ermitteln.

Beispielsweise wird unter eine Pyruvatcarboxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Pyruvat in Oxaloacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter einer Pyruvatcarboxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase umgesetzte Menge Pyruvat bzw. gebildete Menge Oxaloacetat verstanden.

Bei einer erhöhten Pyruvatcarboxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase die umgesetzte Menge Pyruvat bzw. die gebildete Menge Oxaloacetat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugt mindestens 300 %, noch bevorzugt mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Pyruvatcarboxylase -Aktivität des Wildtyps.

Weiterhin wird beispielsweise unter eine Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die Enzymaktivität einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase verstanden.

Unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Oxaloacetat in Phosphoenolpyruvat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. gebildete Menge Phosphoenolpyruvat verstanden.

Bei einer reduzierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. die gebildete Menge Phosphoenolpyruvat reduziert.

Eine Reduzierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase). Vorzugsweise wird die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständige Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase -Aktivität.

Die zusätzliche Erhöhung von Aktivitäten kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Gens durch Aktivatoren oder wie

vorstehend beschrieben durch Erhöhung der Promotoraktivität oder Erhöhung der Expressionsaktivität oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien in den Mikroorganismus.

- 5     Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend ein Protein wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Mikroorganismus eigenen, endogenen Proteine verstanden.

10     Dies kann beispielsweise, wie vorstehend beschrieben durch Veränderung der Promotor- und/oder Expressionseinheits-Sequenzen der Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

15     Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Proteine durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

20     Zur Erzielung einer Erhöhung der Genexpression kann der Fachmann weitere unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombination ergreifen. So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

35     Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0472869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-40     10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195

(1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60 : 512-538 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

5 Weiterhin kann es für die Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, vorteilhaft sein, neben der Expression bzw. Verstärkung eines Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eines der vorstehend beschriebenen Proteine durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein entsprechendes Protein in den Mikroorganismus. Das Einbringen der Nukleinsäure kann chromosomal oder extrachromosomal erfolgen, also durch Erhöhung der Kopienzahl auf dem Chromosom und oder  
15 eine Kopie des Gens auf einem sich replizierenden Plasmid in dem Wirtsmikroorganismus.

Vorzugsweise erfolgt das Einbringen der Nukleinsäure, beispielsweise in Form einer Expressionskassette, enthaltend die Nukleinsäure, chromosomal, insbesondere durch  
20 die vorstehend beschriebene SacB-Methode.

Dazu kann prinzipiell jedes Gen, das eines der vorstehend beschriebenen Proteine kodiert verwendet werden.

25 Bei genomischen Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das der Wirtsmikroorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

30 Beispiele für die entsprechenden Gene sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der vorstehend beschriebenen Aktivitäten in Mikroorganismen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- 35
- Einbringen mindestens einer sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette

- Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen das entsprechende -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 5 • Einbringen mindestens einer den RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in das gewünschte Zielgen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen das Zielgen generiert werden.
- 10
- 15 • Einbringen eines Promotors mit reduzierter Promotoraktivität oder einer Expressionseinheit mit reduzierter Expressionsaktivität.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Reduzierung seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante eines Proteins oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein.

25 Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität eines Proteins bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des Proteins, des Transports des Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung  
30 der Translationselongation oder -termination umfassen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Mikroorganismen ein  
35 Isolieren von biosynthetischen Produkten aus den Mikroorganismen oder/oder aus der Fermentationsbrühe angeschlossen. Diese Schritte können gleichzeitig und/oder vorzugsweise nach dem Kultivierungsschritt stattfinden.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich  
40 oder diskontinuierlich im batch- Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulauf-

verfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen

Als Schwefelquelle für die Herstellung von Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

5

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

- 10 Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

- 15 Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kultumedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue  
20 Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.  
25

- Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.  
30

- Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht läßt sich während der Anzucht durch Zugabe von basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel,  
40

- wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.
- Die so erhaltenen Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.
- Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.
- Die Isolierung von biosynthetischen Produkten aus der Fermentationsbrühe und/oder den Mikroorganismen erfolgt in an sich bekannter Weise entsprechend den physikalisch-chemischen Eigenschaften des biosynthetischen Wertprodukts und den biosynthetischen Nebenprodukten.
- Die Fermentationsbrühe kann anschließend beispielsweise weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.
- Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.
- Es ist aber auch möglich die biosynthetischen Produkte, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produkthaltige Brühe nach dem Abtrennen der Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder ande-

re Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

5

Die biosynthetischen Produkte können in unterschiedlichen Formen anfallen, beispielsweise in Form ihrer Salze oder Ester.

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

20

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden nicht-limitierenden Beispiele näher beschrieben:

25

#### Beispiel 1

#### Konstruktion von Plasmid pCIS lysC

Im ersten Schritt der Stammkonstruktion wurde ein allelischer Austausch des lysC Wildtypgens in *Corynebakterium glutamicum* ATCC13032 durchgeführt. Dabei wurde im lysC Gen ein Nukleotidaustausch durchgeführt, so daß im resultierenden Protein die Aminosäure Thr an der Position 311 durch ein Ile ausgetauscht wurde. Ausgehend von der chromosomalen DNA aus ATCC13032 als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 lysC mit Hilfe des Pfu-Turbo PCR Systems (Stratagene USA) nach Angaben des Herstellers amplifiziert.

35

SEQ ID NO:5

5'-GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC -3'

SEQ ID NO:6

40 5'-CTCTCTCTGTCGACGAATTCAATCTTACGGCCTG-3'

- Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Das amplifizierte Fragment wird an seinem 5'-Ende von einem Sall Restriktionsschnitt und an seinem 3'-Ende von einem MluI Restriktionsschnitt flankiert. Vor der Klonierung wurde das amplifizierte Fragment durch diese beiden Restriktionsenzyme verdaut und mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt.
- 10 Das erhaltenen Polynukleotid wurde über die Sall und MluI Restriktionsschnitte in pCLIK5 MCS integrativ SacB im folgenden pCIS genannt (SEQ ID NO: 7) kloniert und in *E.coli* XL-1 blue transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht. Das Plasmid wurden isoliert und durch Sequenzierung die erwartete Nukleotidsequenz bestätigt. Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet. Das erhaltene Plasmid pCIS-lysC ist als SEQ ID NO:8 aufgeführt.

## Beispiel 2

### Mutagenese des lysC Gens aus *C. glutamicum*

- 25 Die gerichtete Mutagenese des lysC Gens aus *C. glutamicum* wurde mit dem Quick-Change Kit (Fa. Stratagene/USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Mutagenese wurde im Plasmid pCIS lysC, SEQ ID NO:8 durchgeführt. Für den Austausch von thr 311 nach 311ile mit Hilfe der Quickchange Methode (Stratagene) wurden folgende Oligonukleotidprimer synthetisiert:

30

SEQ ID NO:9

5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG -3'

SEQ ID NO:10

35

5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG -3'

- Der Einsatz dieser Oligonukleotidprimer in der Quickchange Reaktion führt in dem lysC Gen SEQ ID NO:11 zu einem Austausch des Nukleotids in Position 932 (von C nach T). Der resultierende Aminosäureaustausch Thr311Ile im lysC Gen wurde nach Transformation in *E.coli* XL1-blue und Plasmidpräparation durch ein Sequenzierungsreaktio-
- 40

nen bestätigt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pCIS lysC thr311ile und ist als SEQ ID NO:12 aufgeführt.

Das Plasmid pCIS lysC thr311ile wurde in *C. glutamicum* ATCC13032 mittels Elektroporation wie bei Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 beschrieben, transformiert. Modifikationen des Protokolls sind in DE 10046870 beschrieben. Die chromosomale Anordnung des lysC-Lokus einzelner Transformanten wurde mit Standardmethoden durch Southernblot und Hybridisierung wie in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben, überprüft. Dadurch wurde sichergestellt, daß es sich bei den Transformanten um solche handelt, die das transformierte Plasmid durch homologe Rekombination am lysC-Lokus integriert haben. Nach Wachstum solcher Kolonien über Nacht in Medien, die kein Antibiotikum enthalten, werden die Zellen auf ein Saccharose-CM-Agarmedium (10% Saccharose, 10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco); 10 g/l Hefeextrakt, 22,0 g/L Agar (Difco)) ausplattiert und bei 30°C für 24 Stunden inkubiert.

Da das im Vektor pCIS lysC thr311ile enthaltende sacB Gen Saccharose in ein toxisches Produkt umwandelt, können nur solche Kolonien anwachsen, die das sacB Gen durch einen zweiten homologen Rekombinationsschritt zwischen dem Wildtyp lysC Gen und dem mutierten Gen lysC thr311ile deletiert haben. Während der homologen Rekombination kann entweder das Wildtyp Gen, oder das mutierte Gen zusammen mit dem sacB Gen deletiert werden. Wenn das sacB Gen zusammen mit dem Wildtyp Gen entfernt wird, resultiert eine mutierte Transformante.

Anwachsende Kolonien wurden gepickt, und auf eine Kanamycin-sensitiven Phänotyp hin untersucht. Klone mit deletiertem SacB Gen müssen gleichzeitig Kanamycin sensitives Wachstumsverhalten zeigen. Solche Kan-sensitiven Klone wurde im einem Schüttelkolben auf ihre Lysin-Produktivität hin untersucht (siehe Beispiel 6). Zum Vergleich wurde der nicht behandelte *C. glutamicum* ATCC13032 angezogen. Klone mit einer gegenüber der Kontrolle erhöhten Lysin-Produktion wurden selektiert, chromosomale DNA gewonnen und der entsprechende Bereich des lysC Gens durch eine PCR-Reaktion amplifiziert und sequenziert. Ein solcher Klon mit der Eigenschaft erhöhter Lysin-Synthese und nachgewiesener Mutation in lysC an der Stelle 932 wurde mit ATCC13032 lysC<sup>thr</sup> bezeichnet.

### Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsplasmids zur Überexpression des lysC-Gens mit Hilfe der heterologen Expressionseinheit Psod (SEQ. ID. NO. 2)

Zur Amplifizierung der Expressionseinheit des Gens, das für die Superoxiddismutase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ ID 13:

5 sod8: 5'- accctggcggaaaccctgagtcg -3'

SEQ ID 14:

sod1: 5'- tacgaccagggccacgggtaaaaaatccttcgtaggttccgcaccgagcatatacatcttttg-3'

10 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 657 bp entsprach.

15 Zur Amplifizierung des Gens, das für die Aspartokinase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ ID 15

lysC2: 5'- cctacgaaaggatttttaccggtggccctggctgtacag-3'

20 SEQ ID 16:

lysC6: 5'- gattagtggaacctcgtcgtc-3'

25 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 lysC<sup>tr</sup> eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1638 bp entsprach.

Die Primer sod1 und ask2 enthalten eine überlappende Sequenz und sind an ihren 5'-Enden homolog zueinander.

30 Die oben erhaltenen PCR-Produkte wurden als Template für eine weitere PCR eingesetzt, in der die folgenden Primer genutzt wurden.

SEQ ID 17:

sod4: 5'- gcggcgcaggattttctaa-3'

35

SEQ ID 18:

lysC4: 5'- tcggttgctgagtaatgtctt-3'

40 Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1811 bp entsprach. Diese Psod/lysC-Fusion wurde dann in den Vektor

pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. In einem weiteren Schritt wurde die Fusion Psod/lysC aus dem Plasmid pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) als 1773 bp EcoRI-Fragment in den Integrationsvektor pK19 mob sacB SEQ ID NO 19 kloniert, der zuvor mit der Restriktionsendonuklease EcoRI  
5 geschnitten worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pk19 mob sacB Psod lysC bezeichnet.

Zur Amplifikation eines 5'-Bereiches des lysC-Gens wurden folgende Oligonukleotide definiert:

10 SEQ ID 20:  
lysC23: 5'- caccgcggtttggacatcactgctac-3'

SEQ ID 21:  
lysC24: 5'- cctggggctttagcggtatgcgtctca-3'

15 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 674 bp entsprach. Dieses DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Ein 787 bp  
20 SspI/XbaI-Fragment wurde dann anschließend in den Vektor pK19 mob sacB Psod lysC kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym NheI verdaut worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pK19 mob sacB Psod lysC + US (SEQ ID 22) bezeichnet. Bis zu diesem Schritt wurden alle Klonierungen in *Escherichia coli* XL-1 Blue (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

25 Mit dem Transformationsplasmid pK19 mobsacB Psod lysC + US wurde dann *E. coli* Mn522 (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) zusammen mit dem Plasmid pTc15AcgIM nach Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 transformiert. Das Plasmid pTc15AcgIM ermöglicht die Methylierung von DNA nach dem  
30 Methylierungsmuster von *Corynebacterium glutamicum* (DE 10046870). Durch diesen Schritt wird eine anschließende Elektroporation von *Corynebacterium glutamicum* mit dem Integrationsplasmid pK19 mob sacB Psod lysC + US ermöglicht. Aus dieser Elektroporation und der nachfolgenden Selektion auf CM-Platten mit Kanamycin (25 µg/ml) wurden mehrere Transkonjuganten erhalten. Zur Selektion auf das zweite Re-  
35 kombinationsereignis, das zur Excision des Vectors samt dem lysC-Promotor und dem lysC-Gen führen soll, wurden diese Transkonjuganten in CM-Medium über Nacht ohne Kanamycin angezogen und anschließend zur Selektion auf CM-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Das auf dem Vektor pK19 mob sacB vorhandenen sacB-Gen kodiert für das Enzym Laevansucrase und führt bei Wachstum auf Saccharose zur Syn-  
40 these von Laevan. Da Laevan für *C. glutamicum* toxisch ist, können nur *C. glutamicum*

Zellen, die das Integrationsplasmid durch den zweiten Rekombinationsschritt verloren haben, auf Saccharose-haltigem Medium wachsen (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466). 100 Saccharose-resistente Klone wurden auf ihre Kanamycin-Sensitivität hin überprüft. Für 57 der getesteten Klone konnte neben der Resistenz gegenüber Saccharose auch eine Sensitivität gegenüber Kanamycin nachgewiesen werden. Ob auch der gewünschte Austausch der natürlichen Expressionseinheit durch die Psod-Expressionseinheit erfolgt war, wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Für diese Analyse wurde chromosomale DNA aus dem Ausgangsstamm und 20 Klonen isoliert. Hierzu wurden die jeweiligen Klone mit einem Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in 100 µl H<sub>2</sub>O suspendiert und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Jeweils 10 µl der erhaltenen Lösung wurden als Template in die PCR eingesetzt. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die zur Psod-Expressionseinheit und dem lysC-Gen homolog sind. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Vorabdenaturierung: 5 min bei 95°C; Denaturierung 30 sec bei 95°C; Hybridisierung 30 sec bei 55°C; Amplifizierung 2 min bei 72°C; 30 Zyklen; End-Extension 5 min bei 72°C. Im Ansatz mit der DNA des Ausgangsstammes konnte durch Wahl der Oligonukleotide kein PCR-Produkt entstehen. Nur bei Klonen, die durch die 2. Rekombination den Austausch des natürlichen Promotors (PlysC) gegen Psod vollzogen haben, wurde ein Bande mit einer Größe von 340 bp erwartet. Insgesamt waren von den getesteten 20 Klonen 2 Klone positiv.

#### Beispiel 4

##### Aspartokinase (lysC) Assay

C. glutamicum Stämme, die entweder eine chromosomale Copy des lysC<sup>fab</sup>-Gens mit dem natürlichen Promotor oder eine chromosomale Copie des Psod lysC<sup>fab</sup> Konstruktes enthielten, wurden in MMA-Medium (20 g/l Glucose, 10 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 g Hamstoff, 5 g NaCl, 400 mg MgSO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O, 10 mg FeSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O, 100 mg L-Leucin, 100 mg L-Cystein, 250 mg Pantothersäure, 5 mg Nicotinamid, 100 µg Biotin, 200 µg Thiamin, 15 g MOPS, pH 6,8) bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 8 angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD<sub>800</sub> von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorffzentrifuge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität der Aspartokinase wurde wie folgt durchgeführt. Reaktionsansätze von 1 ml mit 100 mM Tris-HCl (pH8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 600 mM Hydroxylamin-HCl (pH 7,3,0 mit 10 N KOH), 4 mM ATP, 200 mM Aspartat (Natriumsalz) und H<sub>2</sub>O ad 1 ml wurden für 10 min bei 30°C inkubiert. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestartet und bei 30°C für 30 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 ml der Stopplösung ( 10% Eisenchlorid, 3,3 % Trichloressigsäure, 0,7 N NaCl) zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde OD<sub>540</sub> des Überstandes gemessen. 1 Unit entspricht dabei 1 nmol Aspartat Hydroxamat, das pro mg Protein pro Minute gebildet wird.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a gezeigt.

Tabelle 1a

15

Stamm	spezifische Aktivität [nmol/mg/min]
ATCC 13032 lysC <sup>tr</sup>	19,35
ATCC 13032 Psod lysC <sup>tr</sup>	41,22

Die Aktivität der Aspartokinase konnte durch die Integration des Psod lysC Konstruktes in das Chromosom verdoppelt werden.

20 Beispiel 5  
Produktion von Lysin

Zur Untersuchung der Auswirkung des Psod lysC Konstruktes auf die Lysin-Produktion wurde der Stamm ATCC13032, ATCC13032 lysC<sup>tr</sup> und ATCC13032 Psod lysC<sup>tr</sup> auf CM-Platten (10,0 g/L D-glucose, 2,5 g/L NaCl, 2,0 g/L Harnstoff, 10,0 g/L Bacto Pepton (Difco), 5,0 g/L Yeast Extract (Difco), 5,0 g/L Beef Extract (Difco), 22,0 g/L Agar (Difco), autoklaviert (20 min. 121°C)) für 2 Tag bei 30°C angezogen. Anschließend wurden die Zellen von der Platte abgekratzt und in Saline resuspendiert. Für die Hauptkultur wurden 10 ml Medium I und 0,5 g autoklaviertes CaCO<sub>3</sub> (Riedel de Haen) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit der Zellsuspension bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,5 beimpft und für 39h auf einem vom Typ Infors AJ118 (Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 220 upm inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration des in das Medium ausgeschiedene Lysin bestimmt.

35 Medium I:  
40g/l Saccharose

- 60g/l Melasse (auf 100% Zuckergehalt berechnet)  
 10g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
 0.4g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 0.6g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 5 0.3mg/l Thiamin\*HCl  
 1mg/l Biotin (aus einer 1 mg/ml steril filtrierten Stammlösung die mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  auf pH 8,0 eingestellt wurde)  
 2mg/l  $\text{FeSO}_4$   
 2mg/l  $\text{MnSO}_4$   
 10 mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  auf pH 7,8 eingestellt, autoklaviert (121°C, 20 min).  
 zusätzlich wird Vitamin B12 (Hydroxycobalamin Sigma Chemicals) aus einer Stammlösung (200 µg/ml, steril filtriert) bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/l zugegeben

- Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach Agilent auf einer Agilent 1100 Series LC System HPLC. Eine Vorsäulenderivatisierung mit Ortho-Pthalaldehyd erlaubt die Quantifizierung der gebildeten Aminosäuren, die Auftrennung des Aminosäuregemisch findet auf einer Hypersil AA-Säule (Agilent) statt.  
 Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 2a dargestellt

20

Tabelle 2a

Stamm	L-Lysin (g/l)
ATCC13032	0
ATCC13032 lysC <sup>tr</sup>	10,15
ATCC13032 Psod lysC <sup>tr</sup>	12,67

- Beispiel 6  
 25 Herstellung des Vektors pCLiK5MCS

Zunächst wurden Ampicillinresistenz und Replikationsursprung des Vektors pBR322 mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:23 und SEQ ID NO:24 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

30

SEQ ID NO:23

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACA  
 G-3'

- 35 SEQ ID NO:24

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGGCCGGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTC  
G-3'

5 Neben den zu pBR322 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer  
SEQ ID NO:23 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen  
SmaI, BamHI, NheI und Ascl und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:24 in 5'-3'  
Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, XhoI, NotI und  
DraI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols.  
A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Poly-  
10 merase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit  
einer Größe von ungefähr 2,1 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Puri-  
fication Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.  
Die stumpfen Enden des DNA-Fragmentes wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit  
(Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und  
15 der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Clo-  
ning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente  
E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid  
tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB  
Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

20 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit  
(Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus  
überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.

25 Ausgehend vom Plasmid pWLT1 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reakti-  
on wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:25 und SEQ ID NO:26 eine Ka-  
namycin-Resistenzcassette amplifiziert.

SEQ ID NO:25:  
30 5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ ID NO:26  
5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

35 Neben den zu pWLT1 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer  
SEQ ID NO: 25 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen  
XbaI, SmaI, BamHI, NheI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:26 in 5'-3' Richtung  
die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Ascl und NheI. Die PCR Reaktion  
wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and  
40 Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla,

- USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,3 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und AscI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und AscI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,1kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) und Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK2.
- Der Vektor pCLiK2 wurde mit der Restriktionsendonuklease DraI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ca. 2,3 kb großes Vektorfragment mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers religiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.
- Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK3.

Ausgehend vom Plasmid pWLQ2 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:27 und SEQ ID NO:28 der Replikationsursprung pHM1519 amplifiziert.

5 SEQ ID NO:27:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO:28:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

10

Neben den zu pWLQ2 komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:27 und SEQ ID NO:28 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,7 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK3 wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,3kb) mit dem

15

20

25

30

GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

35 Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5.

Für die Erweiterung von pCLiK5 um eine „multiple cloning site“ (MCS) wurden die beiden synthetischen, weitestgehend komplementären Oligonukleotide SEQ ID NO:29 und SEQ ID NO:30, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, Sall, ClaI, BamHI, XbaI und SmaI enthalten, durch gemeinsames Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment vereinigt.

SEQ ID NO:29:

5'-TCGAATTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCCGGTACCACGCGTCATAT  
GACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAAC  
AATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTAAAT-3'

SEQ ID NO:30:

5'-GATCATTTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAG  
CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAAGTAGTCATATGACGCGTGGTACCG  
GGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTAAAT-3'

Der Vektor pCLiK5 wurde mit den Restriktionsendonuklease XhoI und BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 5,0 kb) mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem synthetischen Doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdaus überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS.

Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS ist als SEQ ID NO:31 aufgeführt.

#### Beispiel 7

#### Herstellung des Plasmids PmetA metA

5

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 32 und SEQ ID NO 33, der chromosomalen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe  
10 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, ein das metA Gen inklusive des nichkodierenden 5'-Bereichs amplifiziert.

SEQ ID NO 32

15 5'-GCGCGGTACCTAGACTCACCCCAGTGCT -3'

und

SEQ ID NO 33

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

20 Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,3 kb Größe wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

25

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 31 wurde mit den Restriktionsenzymen Asp718 und SpeI geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

30 Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid  
35 tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Qiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977)  
40 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt.

Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PmetA metA ist als SEQ ID NO 34: aufgeführt.

5

#### Beispiel 8

#### Herstellung des Plasmids pCLiK5MCS Psod metA

- 10 Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpa-  
riert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 35 und SEQ ID NO 36, der chromoso-  
malen DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe  
der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden wie Innis et al. (1990)  
15 PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press ein DNA Frag-  
ment von ca. 200 Basenpaaren aus dem nichtkodierenden 5'-Bereich (Region der Ex-  
pressionseinheit) der Superoxiddismutase (Psod) amplifiziert.

#### SEQ ID NO 35

- 20 5'-GAGACTCGAGAGCTGCCAATTATTCCGGG-3'

und

#### SEQ ID NO 36

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGGGTAAAAATCCTTTTCG -3'

- 25 Das erhaltene DNA Fragment wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purifica-  
tion Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

- Ausgehend vom Plasmid PmetA metA SEQ ID 34 als Template für eine PCR Reaktion  
wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 37: und SEQ ID NO 38: ein Teil von  
30 metA amplifiziert.

#### SEQ ID NO 37

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

und

- 35 SEQ ID NO 38

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

- Das erhaltene DNA Fragment von ungefähr 470 Basenpaaren wurde mit dem  
GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gerei-  
40 nigt.

In einer weiteren PCR Reaktion wurden die beiden oben erhaltenen Fragmente gemeinsam als Template eingesetzt. Durch die mit dem Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 36 eingebrachten, zu metA homologen Sequenzen, kommt es im Zuge der PCR-Reaktion zu einer Anlagerung beider Fragmente aneinander und einer Verlängerung zu einem durchgehenden DNA-Strang durch die eingesetzte Polymerase. Die Standardmethode wurde dahingehend modifiziert, dass die verwendeten Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 35 und SEQ ID NO: 38 erst mit Beginn des 2. Zykluses dem Reaktionsansatz zugegeben wurden.

10

Das amplifizierte DNA Fragment von ungefähr 675 Basenpaaren wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen XhoI und NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das ca. 620 Basenpaar große DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aus der Agarose aufgereinigt. Das Plasmid PmetA metA SEQ ID NO 34: wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde ein ca. 0,7 kb großes metA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aus der Agarose aufgereinigt.

20

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 31 wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

25

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment und dem metA-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

30

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

40

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PSODmetA ist als SEQ ID NO 39: aufgeführt.

Beispiel 9  
MetA-Aktivitäten

5  
Der Stamm Corynebacterium glutamicum ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmi-  
den pClik5 MCS, pClik MCS PmetA metA, pCLiK5MCS Psod metA, nach der be-  
schriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303)  
transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätz-  
10 lich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu er-  
reichen. Erhaltene Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.

C. glutamicum Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in  
MMA-Medium ((40 g/l Saccharose, 20 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
15 0,25g/l MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 54 g Aces, 1 ml CaCl<sub>2</sub> (10 g/l), 1 ml Protocatechoat (300 mg/10  
ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l FeSO<sub>4</sub> x /H<sub>2</sub>O, 10 g/l MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 2 g/l  
ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l CuSO<sub>4</sub>, 0,02 g/l NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O), 100 µg/l Vitamin B<sub>12</sub>, 0,3 mg/l  
Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin ( 100 mg/l), pH7,0) bei 30°C  
über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit  
20 kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wur-  
den die Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer ( 0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD<sub>600</sub>  
von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml  
Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid  
bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wur-  
25 de durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfsentrifu-  
ge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt  
wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die Messung der enzymatischen Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die  
30 Reaktionsansätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM  
MgCl<sub>2</sub>, 100 µM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 µM DTNB (Ellmans Reagenz)  
und Zellextrakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysate gestar-  
tet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10  
min aufgenommen.

35  
Die Ergebnisse sind in Tabelle 3a gezeigt.

Tabelle 3a

Stamm	spezifische Aktivität
-------	-----------------------

	[nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	12,6
ATCC 13032 pClik5MCS PmetA metA	50,7
ATCC 13032 pClik5MCS Psod metA	100,7

Die Aktivität von MetA konnte durch die Verwendung der heterologen Expressionseinheit Psod erheblich gesteigert werden.

## Patentansprüche

1. Verwendung einer Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
  - 5 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
  - B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist oder
  - 10 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
  - D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)zur Transkription von Genen.
- 15 2. Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.
- 20 3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit enthält:
  - E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
  - 25 F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
  - G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
  - 30 H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionseinheit aus einer Nukleinsäure der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 besteht.
- 35 5. Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend
  - A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
  - B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %

auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist  
oder

C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

5 D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

10 6. Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 5 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

15 7. Expressionseinheit nach Anspruch 6, enthaltend

E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder

F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder

20 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenommen ist.

8. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

30 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder

35 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

40

- 5 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 10 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 15 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 25 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 30 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 35 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 40 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit

Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

5           bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit  
10           erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

          bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß  
15           Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

          bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.  
20

12. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp  
25

          ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder  
30

          br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.  
35

13. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 5
- c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 10
- d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 15
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 20
- d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder
- 25
- d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 30
- d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 35
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp
- 40
- ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

10 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30

35 17. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

- dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylene-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-

- 5 Synthase, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.
- 10
20. Expressionskassette, umfassend
- a) mindestens eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und
- 15 b) mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, und
- c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,
- 20 wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.
- 25 21. Expressionskassette nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren,
- 30 Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen
- 35

22. Expressionskassette nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylene-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serin-hydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase
23. Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22.
24. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch
- a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

- 5           b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.
- 10       25. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 15           b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 20           b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- 25           b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 30       26. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass
- 35           ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder
- 40

5 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

10 27. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 28. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

35 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

40

- 5           br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.
- 10           29. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch
- 15           c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 20           d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.
- 25           30. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man
- 30           d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 35           d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 40

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressions-einheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

31. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass man

10

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

15

dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

20

32. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

25

dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit reduzierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

10

cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

15

dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20

34. Genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu exprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

25

35. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 34, enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.

30

36. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 24 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein

40

aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

37. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthase I, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.
38. Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24 bis 37.
39. Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-

- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrindipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-Oxodoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase,
40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydrindipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OPCA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.
41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der

- Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.
- 5
42. Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-Transferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase II, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend einen RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Ho-
- 40

- moserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystahionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystahionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serin Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität I-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität, Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen.
44. Verfahren nach Anspruch 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
45. Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, , Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend

- einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, , Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein OpcA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Dehydrogenase
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.
47. Verfahren nach Anspruch 45 oder 46, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität , Ketol-Aid-Reductoisomerase- Aktivität, Branched chain aminotransferase- Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase- Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase- Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.
48. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Produkte nach und/oder während des Kultivierungs-

schrittes aus dem Kultivierungsmedium isoliert und gegebenenfalls aufgereinigt werden.

- 5           49. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 10           50. Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
- 15           51. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44.
52. Expressionseinheit gemäß Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. als ribosomale Bindungsstelle verwendet wird.
- 20           53. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43.
- 25           54. Expressionseinheit gemäß Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region verwendet wird.

WO 2005/059144

PCT/EP2004/014337

1  
SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Psod-Expressionseinheiten

<130> PF 55185/Mec

<140> 20030320

<141>

<160> 44

<210> 1

<211> 173

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SUPEROXID\DISMUTASE\RXA03119\

<400> 1

gctgccaatt attccgggct tgtgacccgc tacccgataa ataggtcggc tgaaaaattt 60  
cgttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggaggtgt cgcaccaagt acttttgcga 120  
agcgccatct gacggatttt caaaagatgt atatgctcgg tgcggaaacc tac 173

<210> 2

<211> 191

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SUPEROXID\DISMUTASE\RXA03119\

<400> 2

agctgccaat tattccgggc ttgtgacccg ctacccgata aataggtcgg ctgaaaaatt 60  
tcgttgcaat atcaacaaaa aggcctatca ttgggaggtg tcgcaccaag tacttttgcg 120  
aagcgccatc tgacggattt tcaaaagatg tatatgctcg gtgcggaaac ctacgaaagg 180  
attttttacc c 191

<210> 3

<211> 1365

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> RXA00077

<400> 3

atgaatgatg agaattattca aagctccaac tatcagccat tcccaggttt tgacgattgg 60  
aaacagatcg aggtgtcgtc cttagatgtc atcgaatcct cacgccattt ttctgatttg 120  
aaagatagca ctgatcggtc tgcgttagat gctgcgctag agagagcaaa aagagctgcc 180  
gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcggttt tacccatata 240  
gttgcaacgc aggtaggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag 300

cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcgatgcagt aactggtaga 360  
 actccaatct ctcagcaatg gattagaaat ttgcacgccg tcattctgcg gagccaagaa 420  
 agccacgagg tttttacagc cgttggagtc caaaatcagg cgcttcagaa aggcgagtat 480  
 aaaactcagc caaatagtcc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cgccccagtt 540  
 gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600  
 gcagccgaga aggttattca agctgcctat gccactatg ctttcgtatg tattcatcct 660  
 tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgtttttct atacaaagat 720  
 cctggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780  
 gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840  
 actattaact ctattatcgt tgatctcact accccgatcg cgggtaaate tggttcggct 900  
 aagctttcgg atgcgctacg cccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960  
 aggctccaag aaagtttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020  
 aatggggttg agtttctact tcaacggatt tttatcggtt cccattcaa tctgccagag 1080  
 ggctataacg ctttccctga tagctattgt ctgacctag ctttcaatag caactctcca 1140  
 aaacaaatct tccaccgct atccatagta atagcagctc gagatgggaa aagagcgagc 1200  
 agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaactttc acgcttacgg acgtgaagtc 1260  
 gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgccga cgggattgta 1320  
 gatcacttct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 454

&lt;212&gt; PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

&lt;400&gt; 4

Met	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Gln	Ser	Ser	Asn	Tyr	Gln	Pro	Phe	Pro	Ser
1				5					10					15	
Phe	Asp	Asp	Trp	Lys	Gln	Ile	Glu	Val	Ser	Leu	Leu	Asp	Val	Ile	Glu
			20					25					30		
Ser	Ser	Arg	His	Phe	Ser	Asp	Leu	Lys	Asp	Ser	Thr	Asp	Arg	Ser	Ala
		35					40					45			
Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Ala	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Val	Asp	Thr
		50				55					60				
Asn	Ala	Ile	Glu	Gly	Ile	Phe	Gln	Thr	Asp	Arg	Gly	Phe	Thr	His	Thr
65					70				75					80	
Val	Ala	Thr	Gln	Val	Gly	Ala	Trp	Glu	Gln	Gln	Met	Ala	Met	Lys	Gly
			85						90					95	
Lys	His	Val	Lys	Pro	Ala	Phe	Asp	Asp	Thr	Leu	Glu	Gly	Phe	Glu	Tyr
			100					105					110		

Val Leu Asp Ala Val Thr Gly Arg Thr Pro Ile Ser Gln Gln Trp Ile  
115 120 125

Arg Asn Leu His Ala Val Ile Leu Arg Ser Gln Glu Ser His Glu Val  
130 135 140

Phe Thr Ala Val Gly Val Gln Asn Gln Ala Leu Gln Lys Gly Glu Tyr  
145 150 155 160

Lys Thr Gln Pro Asn Ser Pro Gln Arg Ser Asp Gly Ser Val His Ala  
165 170 175

Tyr Ala Pro Val Glu Asp Thr Pro Ala Glu Met Ala Arg Phe Ile Ser  
180 185 190

Glu Leu Glu Ser Lys Glu Phe Leu Ala Ala Glu Lys Val Ile Gln Ala  
195 200 205

Ala Tyr Ala His Tyr Ala Phe Val Cys Ile His Pro Phe Ala Asp Gly  
210 215 220

Asn Gly Arg Val Ala Arg Ala Leu Ala Ser Val Phe Leu Tyr Lys Asp  
225 230 235 240

Pro Gly Val Pro Leu Val Ile Tyr Gln Asp Gln Arg Arg Asp Tyr Ile  
245 250 255

His Ala Leu Glu Ala Ala Asp Lys Asn Asn Pro Leu Leu Leu Ile Arg  
260 265 270

Phe Phe Ala Glu Arg Val Thr Asp Thr Ile Asn Ser Ile Ile Val Asp  
275 280 285

Leu Thr Thr Pro Ile Ala Gly Lys Ser Gly Ser Ala Lys Leu Ser Asp  
290 295 300

Ala Leu Arg Pro Thr Arg Val Leu Pro Glu Leu His Asp Ala Ala His  
305 310 315 320

Arg Leu Gln Glu Ser Leu Phe Thr Glu Ile Arg Ser Arg Leu Asp Glu  
325 330 335

Glu Gly Lys Arg Asn Gly Leu Glu Phe Leu Leu Gln Arg Ile Phe Ile  
340 345 350

Gly Ser Pro Phe Asn Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Ala Phe Pro Asp Ser  
355 360 365

Tyr Cys Leu Thr Leu Ala Phe Asn Ser Asn Ser Pro Lys Gln Ile Phe  
370 375 380

His Pro Leu Ser Ile Val Ile Ala Ala Arg Asp Gly Lys Arg Ala Ser  
385 390 395 400

Ser Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Asn Phe His Ala Tyr  
405 410 415

Gly Arg Glu Val Glu Pro Val Val Thr Glu Ser Phe Arg Glu Arg Val  
420 425 430

Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala  
435 440 445

Lys Lys Phe Gln Gln Asn  
450

<210> 5  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> SEQ\_ID5

<400> 5  
gagagagaga cgcgtcccag tggctgagac gcatc

35

<210> 6  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> SEQ\_ID\_6

<400> 6  
ctctctctgt cgacgaattc aatcttacgg cctg

34

<210> 7  
<211> 4323  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> SEQ\_ID\_7

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (457)..(1248)  
<223> KanR

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1515)..(2375)  
<223> Ori-EC (pMB)

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1515)..(2375)  
<223> Ori-EC (pMB) complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2418)..(3839)  
<223> SacB complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3840)..(4302)  
<223> PsacB complement

<400> 7  
tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttcg gacctaggga 60

tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga 120  
tttaaatacgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180  
cggtagctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240  
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcgggtt 300  
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa gggtgggaag 360  
ccctgcaaag taaactggat ggcttttctt cgcgaagga tctgatggcg caggggatca 420  
agatctgac aagagacagg atgaggatcg ttctgcata ttgaacaaga tggattgcac 480  
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540  
atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600  
gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgagycagc gcggctatcg 660  
tggctggcca cgacgggctt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720  
aggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780  
cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840  
gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaag catcgcatcg agcagcacg tactcggatg 900  
gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960  
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcagc cccgacggcg aggatctcgt cgtgacctat 1020  
ggcgtgcct gcttgccgaa tatcatgggt gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac 1080  
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggtac ccgtgatatt 1140  
gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttctcgt tgctttacgg tatcgccgct 1200  
cccgatcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260  
tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320  
ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380  
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc gcgccggccg 1440  
gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500  
gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560  
cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620  
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680  
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740  
aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800  
cctgttcga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggggaagcgtg 1860  
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggctcg tcgctccaag 1920  
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgctcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 1980

cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040  
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100  
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtgggtttt 2220  
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 2340  
agattatcaa aaaggatcct cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgccatcgg 2400  
cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460  
ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520  
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580  
ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaggtta catcgtagg atcaagatcc 2640  
atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtatg ggccagttaa agaattagaa 2700  
acataaccaa gcatgtaaat atcgtagac gtaatgccgt caatcgtcac ttttgatccg 2760  
cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttta agacgttcgc gcgttcaatt 2820  
tcattctgta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca 2880  
tcgttttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940  
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000  
ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccattctcag ttccagtgtt tgcttcaaatt 3060  
actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgctg 3120  
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt tttccgtca 3180  
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240  
gatacgttaa cttgtgcagt tgtcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300  
gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaagtgtg ctgaacctga ccattcttgt 3360  
gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg 3420  
ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagt tccgccactt tttgatagaa catgtaaatc 3480  
gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaatacaa agacgatgtg gtagccgtga 3540  
tagtttgca cagtgccgtc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600  
tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660  
tttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720  
gtttccttat atggcttttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780  
agcagtgcgg tagtaaagg taatactgtt gcttgttttg caaacttttt gatgttcac 3840  
gttcatgtct ccttttttat gtactgtgtt agcggctctg ttcttcagc cctcctgttt 3900

gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960  
caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020  
ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactggtct 4080  
attttcctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140  
actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcatgg 4200  
gcataaagtt gccttttttaa tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260  
taatagttaa cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcggccg ctcgatttaa 4320  
atc 4323

<210> 8  
<211> 5860  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> PCIS\LYSC

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (155)..(1420)  
<223> lysC

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1974)..(2765)  
<223> KanR

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3032)..(3892)  
<223> Ori-EC complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3913)..(3934)  
<223> sacB downstream complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3935)..(5356)  
<223> sacB (Bacillus Subtilis) complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5357)..(5819)  
<223> Promotor sacB complement

<400> 8  
cccggtagca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60  
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120  
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180  
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240

caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300  
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360  
cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420  
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480  
aaacgcacgc attgttgatg tcaactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540  
gatctgcatt gttgctggtt tccaggggtg taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600  
gggtcgtggt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttgga gctgctttga acgctgatgt 660  
gtgtgagatt tactcggacg ttgacgggtg gtataccgct gacccgcgca tcgttcctaa 720  
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctggttgctc 780  
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840  
acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatatctc 900  
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960  
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020  
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080  
catcaccttc acctgccctc gttccgacgg ccgccgcgcg atggagatct tgaagaagct 1140  
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200  
cgtgggtgct ggcatgaagt ctcacccagg tgttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260  
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtatct ccgtgctgat 1320  
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggcgg 1380  
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaag gagtagtttt 1440  
acaatgacca ccatcgcatg tgttggtgca accggccagg tcggccagggt tatgcgacc 1500  
cttttggaag agcgcaattt ccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560  
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620  
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680  
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740  
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800  
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcct 1860  
ctggttaagggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920  
gatggcgag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg 1980  
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttggtt ggagaggcta ttcggctatg 2040  
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100  
ggcggccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160

aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220  
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280  
tgtcatctca cttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340  
tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcacgcagc 2400  
gagcacgtac tcggatggaa gccgggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460  
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 2520  
atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catgggtggaa aatggccgct 2580  
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640  
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaat ggctgaccgc ttctcgtgc 2700  
tttacggtat cgcgctccc gattcgcagc gcacgcctt ctatgcctt cttgacgagt 2760  
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 2820  
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 2880  
ggacgcccgc tggatgatcc tccagcgcg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940  
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000  
gcacagggcg ctcttccgct tcctcgtca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc 3060  
ggcgagcggc atcagctcag tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120  
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180  
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc ccctgacga gcacacaaa aatcgacgct 3240  
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 3300  
gtccctcgt gcgctctct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttc 3360  
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3420  
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480  
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 3540  
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 3600  
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660  
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720  
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780  
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840  
aagggaattt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900  
gccgcggccg ccatcgcat tttcttttgc gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960  
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg tttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020  
tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080

tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140  
cgttaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200  
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatac gtttagacgta atgccgtcaa 4260  
tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtaacca tttgccgttc attttaaaga 4320  
cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgttagatgc aatcagcggg ttcactactt 4380  
ttttcagtgt gtaatcatcg ttttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440  
ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500  
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560  
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620  
tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt 4680  
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740  
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800  
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860  
aacctgacca ttcttggtgt ttgtctttta ggatagaatc atttgcacg aatttgctgc 4920  
tgtcttttaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtctcg ccgacttttt 4980  
gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg cttttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040  
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100  
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160  
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220  
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttcttcc gcaaacgctt 5280  
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaagggttaa tactgttgct tgttttgcaa 5340  
actttttgat gttcatcggt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400  
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460  
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520  
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 5580  
tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640  
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700  
tagtttctgt tgcattgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760  
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820  
gcggccgctc gatttaaatac tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ\_ID\_9

<400> 9

cggcaccacc gacatcatct tcacctgccc tcgttccg

38

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ\_ID\_10

<400> 10

cggaacgagg gcaggtgaag atgatgtcgg tgggtgccg

38

<210> 11

<211> 1263

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC-GEN

<400> 11

gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60

aacgtcgtg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt gggtgtctgc 120

tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180

ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggt agcgtatttc taacgctctc 240

gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300

ggtgtgtctc ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360

gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgtaat 420

aaagaaacc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtgggt ctgacaccac tgcagttgcg 480

ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540

accgctgacc cgcgcatcgt tcctaattgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600

atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggtgc tgcgcagtgt tgaatacgt 660

cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720

attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgcgcaacc 780

gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840

aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900

tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960

cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020

gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtggt 1080  
accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140  
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgac tggatgctgc tgcacgtgca 1200  
ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260  
cgc 1263

<210> 12  
<211> 5860  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> PCIS\LYSC\THR311ILE

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (155)..(1420)  
<223> LysC

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1974)..(2765)  
<223> KanR

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3032)..(3892)  
<223> Ori-EC (pMB)

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3913)..(3934)  
<223> C\_region : sacB downstream (complement)

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3935)..(5356)  
<223> sacB Bacillus Subtilis (complement)

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5357)..(5819)  
<223> Promotor sacB (complement)

<400> 12  
cccggtagca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60  
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120  
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180  
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240  
caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300  
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360  
cctgactgct ggtgagcgta tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420

cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctgggtgtg ctcaccaccg agcgccacgg 480  
aaacgcacgc attgttgatg tctctccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540  
gatctgcatt gttgctgggt tccaggggtg taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600  
gggtcgtggg ggttctgaca cctactgcagt tgcgttgga gctgctttga acgctgatgt 660  
gtgtgagatt tactcggacg ttgacgggtg gtataccgct gacccgcgca tcgttcttaa 720  
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaatgctg gaacttgctg ctgttggtc 780  
caagattttg gtgctgcga gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840  
acgctcgtct tatagtaatg atcccgccac ttgtattgcc ggctctatgg aggatattcc 900  
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960  
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020  
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080  
catcatcttc acctgccctc gttccgacgg ccgcccgcgc atggagatct tgaagaagct 1140  
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200  
cgtgggtgct ggcataagt ctcaccacgg tggtaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260  
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtatct ccgtgctgat 1320  
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggagg 1380  
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaag gagtagtttt 1440  
acaatgacca ccatcgcagt tgttggtgca accggccagg tcggccagggt tatgcgcacc 1500  
cttttggaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560  
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620  
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680  
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740  
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800  
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgcctt 1860  
ctggtaagggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920  
gatggcgag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcggtt cgcattgatg 1980  
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040  
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100  
ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtg cctgaatgaa ctgcaggacg 2160  
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220  
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280  
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340

tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcatacgagc 2400  
gagcacgtac tcggatggaa gccgggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460  
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 2520  
atctcgctcg gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580  
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640  
tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaat ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700  
tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgccct ctatcgccct cttgacgagt 2760  
tcttctgagc gggactctgg gggtcgaaat gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc 2820  
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 2880  
ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcg ggatctcatg ctggagtctc tcgcccacgc 2940  
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000  
gcatcaggcg ctcttccgct tctcgcctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc 3060  
ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120  
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180  
cgttgctggc gtttttccat aggtccgccc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240  
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa 3300  
gtccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgccttc 3360  
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3420  
aggtcgcttc ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480  
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 3540  
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatg aggcggtgct acagagttct 3600  
tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc 3660  
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720  
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780  
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840  
aagggatctt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900  
gccgcggccg ccatcgcat tttcttttgc gtttttattt gtttaactgtt aattgtcctt 3960  
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020  
tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa 4080  
tcacgacatt gtttcttttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140  
cgtaggatac aagatccatt ttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200  
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatac gttagacgta atgccgtcaa 4260

tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca ttgccgttc attttaaaga 4320  
cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgtagatgc aatcagcggg tcatcactt 4380  
ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt gctaactcag 4440  
ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500  
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560  
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620  
tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt 4680  
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740  
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800  
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860  
aacctgacca ttcttgtgtt tggctcttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgctgc 4920  
tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980  
gatagaacat gtaaactgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040  
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100  
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160  
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220  
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttcttcc gcaaacgctt 5280  
gagttgcgcc tcctgccagc agtgccgtag taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa 5340  
actttttgat gttcatcggt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400  
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460  
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520  
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 5580  
tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640  
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcatctctt gtatttttta 5700  
tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760  
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820  
gcggccgctc gatttaaatc tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SOD8

&lt;400&gt; 13

accctggcgg aaaccctgag tcg

23

<210> 14

<211> 65

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SOD1

<400> 14

tacgaccagg gccacgggta aaaaatcctt tcgtaggttt ccgcaccgag catatacatc 60

ttttg

65

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC2

<400> 15

cctacgaaag gatttttttac ccgtggccct ggtcgtacag

40

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC6

<400> 16

gattagtgga acctcgtcgt c

21

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SOD4

<400> 17

gcggcgcagg attttctaa

19

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> LYSC4

<400> 18

tcggttgcct gagtaatgtc tt

22

<210> 19  
<211> 5720  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> PK19

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2706)..(3968)  
<223> lysC complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3969)..(4166)  
<223> Psod complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4538)..(5236)  
<223> 5' lysC complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5626)..(6420)  
<223> KanR

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6449)..(6911)  
<223> PsacB

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6912)..(6)  
<223> sacB

<400> 19  
ggtcgactct agaggatccc cgggtaccga gctcgaattc actggccgtc gttttacaac 60  
gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt 120  
tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca 180  
gcctgaatgg cgaatggcga taagctagct tcacgctgcc gcaagcactc agggcgcaag 240  
ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg ctgaccccg 300  
atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag 360  
gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc 420  
gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac 480  
tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgaggg gatcaagatc tgatcaagag 540  
acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc 600  
gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat 660  
gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc tttttgtcaa gaccgacctg 720

tccggtgccc tgaatgaact ccaagacgag gcagcgcggc tategtggct ggccacgacg 780  
ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta 840  
ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcctctcacc ttgctcctgc cgagaaagta 900  
tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggtg catagcgtt atccggctac ctgcccattc 960  
gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctcttgc 1020  
gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg 1080  
ctcaaggcgc ggatgcccga cggcgaggat ctgctcgtga cccatggcga tgcctgcttg 1140  
ccgaatatca tgggtgaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt 1200  
gtggcggacc gctatcagga catagcgtt gctaccctg atattgctga agagcttggc 1260  
ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc 1320  
atcgcccttct atcgcccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgctagag 1380  
gatcgatcct ttttaacca tcacatatac ctgccgttca ctattattta gtgaaatgag 1440  
atattatgat attttctgaa ttgtgattaa aaaggcaact ttatgccat gcaacagaaa 1500  
ctataaaaaa tacagagaat gaaaagaaac agatagattt tttagttctt taggcccgtg 1560  
gtctgcaaat ctttttatga ttttctatca aacaaaagag gaaaatagac cagttgcaat 1620  
ccaaacgaga gtctaataga atgaggtcga aaagtaaadc gcgcgggttt gttactgata 1680  
aagcaggcaa gacctaaaat gtgtaaaggg caaagtgtat actttggcgt cacccttac 1740  
atatttttagg tcttttttta ttgtgcgtaa ctaacttgc atcttcaaac aggagggctg 1800  
gaagaagcag accgctaaca cagtacataa aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa 1860  
agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct ttactaccgc actgctggca ggaggcgcaa 1920  
ctcaagcgtt tgcgaaagaa acgaaccaa agccatataa ggaaacatac ggcatttccc 1980  
atattacag ccatgatatg ctgcaaatcc ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag 2040  
tttctgaatt tgattcgtcc acaattaaaa atatctcttc tgcaaaaggc ctggacgttt 2100  
gggacagctg gccattacaa aacgctgacg gcactgtcgc aaactatcac ggctaccaca 2160  
tcgtctttgc attagccgga gatcctaaaa atgcggatga cacatcgatt tacatgttct 2220  
atcaaaaagt cggcgaaact tctattgaca gctggaaaaa cgctggccgc gtctttaaaag 2280  
acagcgacaa attcgatgca aatgattcta tcctaaaaga ccaaacacaa gaatggtcag 2340  
gttcagccac atttacatct gacggaaaaa tccgtttatt ctacactgat ttctccggtg 2400  
aacattacgg caaacaacaa ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct 2460  
ctttgaacat caacggtgta gaggattata aatcaatctt tgacggtgac ggaaaaacgt 2520  
atcaaaatgt acagcagttc atcgatgaag gcaactacag ctgaggcgac aaccatacgc 2580  
tgagagatcc tcactacgta gaagataaag gccacaaata cttagtattt gaagcaaaaa 2640

ctggaactga agatggctac caaggcgaag aatcttttatt taacaaagca tactatggca 2700  
aaagcacatc attcttccgt caagaaagtc aaaaacttct gcaaagcgat aaaaaacgca 2760  
cggctgagtt agcaaacggc gctctcggtg tgattgagct aaacgatgat tacacactga 2820  
aaaaagtgat gaaaccgctg attgcatcta acacagtaac agatgaaatt gaacgcgcga 2880  
acgtctttaa aatgaacggc aaatggtacc tgttcactga ctcccgcgga tcaaaaatga 2940  
cgattgacgg cattacgtct aacgatattt acatgcttgg ttatgtttct aattctttaa 3000  
ctggcccata caagccgctg aacaaaactg gccttggtgt aaaaatggat cttgatccta 3060  
acgatgtaac ctttacttac tcacacttcg ctgtacctca agcgaaagga aacaatgtcg 3120  
tgattacaag ctatatgaca aacagaggat tctacgcaga caaacaatca acgtttgcgc 3180  
cgagcttcct gctgaacatc aaaggcaaga aaacatctgt tgtcaaagac agcatccttg 3240  
aacaaggaca attaacagtt aacaaataaa aacgcaaaag aaaatgccga tgggtaccga 3300  
gcgaaatgac cgaccaagcg acgcccàacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg 3360  
ccttctatga aagggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccctcgcg gacgtgctca 3420  
tagtccacga cgcccgatgat tttgtagccc tggccgacgg ccagcaggta ggccgacagg 3480  
ctcatgccgg ccgcccggcg cttttcctca atcgctcttc gttcgtctgg aaggcagtac 3540  
accttgatag gtgggctgcc cttcctgggt ggcttggttt catcagccat ccgcttgccc 3600  
tcattctgta cgccggcggt agccggccag cctcgcagag caggattccc gttgagcacc 3660  
gccaggtgcg aataagggaac agtgaagaag gaacaccgcg tcgcgggtgg gcctacttca 3720  
cctatcctgc ccggctgacg ccgttgata caccaaggaa agtctacacg aaccctttgg 3780  
caaaatcctg tatatcgtgc gaaaaaggat ggatataccg aaaaaatcgc tataatgacc 3840  
ccgaagcagg gttatgcagc ggaaaagcgc tgcttcctg ctgttttggt gaatatctac 3900  
cgactggaaa caggcaaatg caggaaatta ctgaactgag gggacaggcg agagacgatg 3960  
ccaaagagct cctgaaaatc tcgataactc aaaaaatag cccggtagtg atcttatttc 4020  
attatggtga aagttggaac ctcttacgtg ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt 4080  
ggcccagggc ttcccggat caacaggga accaggattt atttattctg cgaagtgatc 4140  
ttccgtcaca ggtatttatt cggcgcaaag tgcgtcgggt gatgctgcca acttactgat 4200  
ttagtgatg atggtgtttt tgaggtgctc cagtggcttc tgtttctatc agctcctgaa 4260  
aatctcgata actcaaaaaa tacgcccggg agtgatctta tttcattatg gtgaaagttg 4320  
gaacctctta cgtgccgatc aacgtctcat tttcgccaaa agttggccca gggcttcccg 4380  
gtatcaacag ggacaccagg atttatttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggattt 4440  
tattcggcgc aaagtgcgtc gggatgatgct gccaaacttac tgatttagtg tatgatggtg 4500  
tttttgaggt gctccagtgg cttctgtttc tatcagggct ggatgatcct ccagcgcggg 4560

gatctcatgc tggagttctt cgcccacccc aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 4620  
aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 4680  
gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 4740  
acaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 4800  
tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag 4860  
ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 4920  
atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 4980  
agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag 5040  
cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 5100  
agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 5160  
acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 5220  
gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc 5280  
ctatgyaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 5340  
gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 5400  
gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 5460  
gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 5520  
tgcagctggc acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat 5580  
gtgagttagc tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg 5640  
ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 5700  
gccaagcttg catgcctgca 5720

<210> 20  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> LYSC23

<400> 20  
caccgcggct ttggacatca ctgctac

27

<210> 21  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> LYSC24

<400> 21  
cctggggctt tagcggatgc gtctca

26

<210> 22  
<211> 8324  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> PK19

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2706)..(3968)  
<223> lysC complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3969)..(4166)  
<223> Psod complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4538)..(5236)  
<223> 5' lysC complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5626)..(6420)  
<223> KanR

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6449)..(6911)  
<223> PsacB

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6912)..(6)  
<223> sacB

<400> 22  
aaacgcaaaa gaaaatgccg atgggtaccg agcgaaatga ccgaccaagc gacgccaac 60  
ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaagggtggg cttcggaatc 120  
gttttcgggg acgccctcgc ggacgtgctc atagtccacg acgcccgta tttttagacc 180  
ctggccgacg gccagcaggt aggcgcacag gctcatgccg gccgccgccg ccttttcctc 240  
aatcgetctt cgttcgtctg gaaggcagta caccttgata ggtgggctgc ccttcctggt 300  
tggttggtt tcatcagcca tccgcttgcc ctcatctgtt acgccggcgg tagccggcca 360  
gcctcgcaga gcaggattcc cgttgagcac cgccaggtgc gaataaggga cagtgaagaa 420  
ggaacacccg ctgcgggtg ggcctacttc acctatcctg cccggctgac gccgttggt 480  
acaccaagga aagtctacac gaaccctttg gcaaaatcct gtatatcgtg cgaaaaagga 540  
tgatatacc gaaaaaatcg ctataatgac cccgaagcag gggtatgcag cggaaaagcg 600  
ctgcttcctt gctgttttgt ggaatatcta ccgactggaa acaggcaaatt gcaggaaatt 660  
actgaactga ggggacaggc gagagacgat gccaaagagc tcctgaaaat ctcgataact 720

caaaaaatac gcccggtagt gatcttattt cattatggtg aaagttggaa cctcttacgt 780  
gccgatcaac gtctcatttt cgccaaaagt tggcccaggg cttcccggta tcaacagggg 840  
caccaggatt tatttattct gcgaagtgat cttccgtcac aggtatttat tcggcgcaaa 900  
gtgcgtcggg tgatgctgcc aacttactga tttagtgtat gatggtgttt ttgaggtgct 960  
ccagtggctt ctgtttctat cagctcctga aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg 1020  
tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt ggaacctctt acgtgccgat caacgtctca 1080  
ttttcgccaa aagttggccc agggcttccc ggtatcaaca gggacaccag gatttattta 1140  
ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggat ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc 1200  
tgccaactta ctgatttagt gtatgatggt gtttttgagg tgctccagt gcttctgttt 1260  
ctatcagggc tggatgatcc tccagcgcg ggtatctcatg ctggagttct tcgcccaccc 1320  
caaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga 1380  
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc 1440  
tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt 1500  
ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc 1560  
gcagatacca aatactgttc ttctagtgt gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc 1620  
tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg 1680  
cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 1740  
gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga 1800  
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc 1860  
ggacaggat ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 1920  
gggaaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 1980  
atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt 2040  
tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc 2100  
tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg 2160  
aacgaccgag cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc 2220  
gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgaactg 2280  
gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtaggttag ctcaactcatt aggcacccca 2340  
ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt 2400  
tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctt gcatgcctgc aggtcgactc 2460  
tagaggatcc ccgggtaccg agctcgaatt cgccctttcg gttgcctgag taatgtcttc 2520  
tacctcgatt tccgtgccac ggaattcaat cttacggcct gcggaacgtg gggaagcaaa 2580  
gaaacgaaca gtgtcagctg ggaaattgcg ctcttccaaa aggggtgcga taacctggcc 2640

gacctggccg gttgcaccaa caactgcgat ggtggtcatt gtaaaactac tcctttaaaa 2700  
ctttagcgtc cgggtgcctgc ataaacgacg gcttcgtctt cgccgcccag ctggaactgc 2760  
tcatgcaatg cacgtgcagc agcatccaga tcattcttcac ggatcagcac ggaaatacga 2820  
atctcagagg tggaatcaa ttcgatgttc acgttgacat cgcgcagagc ttccatgaac 2880  
tctgcggtaa cacctgggtg agacttcatg ccagcaccca cgaggagac tttgccgacc 2940  
tggtcgtcgt aaagcacatt ggtccagttg ccctgaacct gaagcttctt caagatctcc 3000  
atcgcgcggc ggccgtcggg acgagggcag gtgaagatga tgtcgggtgt gccgtcttct 3060  
acagaagaga cgttctgcag aaccatgtca atgttgattt ctgcatcagc caacgcacgg 3120  
aaaaccttcg cagcctcgcc tggcttatcg gaaataccca gaacggttac tttggcttcg 3180  
gacttgctcg ttgcgacacc ggtaaggact gcttcttcca caggaatata ctccatagag 3240  
ccggcaatca aagtgccggg atcattacta taagacgagc gtacgcgaag tggcacattg 3300  
aatgcacgag cgtattcaac actgcgcagc accaaaatct tggagccaac agcagcaagt 3360  
tccagcattt cttcgaagct gagcttttcc agcttctgtg cattaggaac gatgcgcggg 3420  
tcagcgggat acacaccgtc aacgtccgag taaatctcac acacatcagc gttcaaagca 3480  
gctgccaacg caactgcagt ggtgtcagaa ccaccacgac ccaacgtggt gacatcgcg 3540  
gtttctttat taacaccctg gaaaccagca acaatgcaga tcttgccctc atcgagtgt 3600  
tcacgcacac gacctggagt gacatcaaca atgcgtgcgt ttccgtggcg ctcggtggtg 3660  
agcacaccag cctgagagcc cgtgaaagat tgggcttctg cgccaaggga ctcaatagcc 3720  
atggcgacga gagcgttaga aatacgtca ccagcagtcg ggagcatata catttcacga 3780  
gctggcgga cgggattcac tgccgctgca agttctagaa gttcatccgt ggtgtctccc 3840  
attgcggagc agacaaccac gacatcattt ccagccttct tgggtggcaac gatccgttca 3900  
gcgacgtttc taatgcgttc cgcactctca agcgaggaac cgccatattt ctgtacgacc 3960  
agggccacgg gtaaaaaatc ctttcgtagg tttccgcacc gagcatatac atcttttgaa 4020  
aatccgtcag atggcgcttc gcaaaagtac ttggtgcgac acctcccaat gataggcctt 4080  
tttgttgata ttgcaacgaa atttttcagc cgacctattt atcgggtagc gggtcacaag 4140  
cccgaataa ttggcagcta agtagggttg aagggcataa ggcttctca attttcgaaa 4200  
ggaacattcc tgttatggca tgggttttcg caccggaacc cgtgatggtt accgctgatg 4260  
aggcgcttaa aggtggcagg catcctgttt tagaaaatcc tgcgccgcaa gggcgaattc 4320  
actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaacctt ggcgttacct aacttaatcg 4380  
ccttgacgca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 4440  
cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcga taagctagat gcatgctcga 4500  
gcggccgcca gtgtgatgga tatctgcaga attcgccctt ggggctttag cggatgcgtc 4560

tcagccactg ggacgcgttc caataaacag accatatatt gatattcgat ttaatatttg 4620  
agacaaaagt gacaggtgct acttcgcgag caactcttta gtcaactacc ctgaatcaag 4680  
tgcaaagcaa tctgctcgcc gtgcttttcg ccctagcatc ggcattaaca atcgcatggg 4740  
gcaccgtggt cagacaccgg atcgcgctcc gcaccccaaa agatggctcc ctaaggagct 4800  
cacctttact caatgctctg atgacaccga tgtggtgggc aggcattgagt accgcgatgc 4860  
tggcataattt cttacaaaca gtagcacttg gtttcggcac cctcttggtg gtgcaaccag 4920  
tgcttgctct gtcgctgatg ttcacgctgc cgctctcagc acgattcaat ggctaccgac 4980  
tacgccgaac tgaaatcttc tgggctaccc tcctcacctg agccgtgggc atcatgatcg 5040  
ttttgggacg ccccttccc ggaaaccccc acccccactc gatcgatgga ttccagtact 5100  
tttagtcggc gttgcagtaa tgggtggaat gtggctgctt gcggaatacg tattaagaa 5160  
ggacaaagcc ctcattcttg gtcttgtagc ggggtgattg tttggctacg tagcagtgat 5220  
gtccaaagcc gcggtgaagg gcgaattcca gcacactggc ggccgttact agcttcacgc 5280  
tgccgcaagc actcagggcg caagggctgc taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt 5340  
ccgcagaaac ggtgctgacc ccgatgaat gtcagctact gggctatctg gacaagggaa 5400  
aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc ttacatggcg atagctagac 5460  
tgggcggttt tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtgag 5520  
gttggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc 5580  
aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 5640  
ggattgcacg caggttctcc ggccgcttg gtggagaggc tattcggcta tgactgggca 5700  
caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttcggc tgtcagcgca ggggcgccc 5760  
gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactccaaga cgaggcagcg 5820  
cggtatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgtcact 5880  
gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct 5940  
caccttgctc ctgcgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 6000  
cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaac atcgcatcga gcgagcacgt 6060  
actcggatgg aagccggtct tgctgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 6120  
gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcggatgc ccgacggcga ggatctcgtc 6180  
gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggttg aaaatggccg cttttctgga 6240  
ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggc gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 6300  
cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt 6360  
atcgccgctc ccgattcgca gcgcacgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 6420  
gcgggactct ggggttcgct agaggatcga tcctttttaa cccatcacat atacctgccg 6480

ttcactatta tttagtgaat tgagatatta tgatattttc tgaattgtga ttaaaaaggc 6540  
aactttatgc ccatgcaaca gaaactataa aaaatacaga gaatgaaaag aaacagatag 6600  
atTTTTtagt tctttaggcc cgtagtctgc aaatcctttt atgattttct atcaaacaaa 6660  
agaggaaaat agaccagttg caatccaaac gagagtctaa tagaatgagg tcgaaaagta 6720  
aatcgcgcg gtttggttact gataaagcag gcaagaccta aaatgtgtaa agggcaaagt 6780  
gtatactttg gcgtcacccc ttacatatatt taggtctttt tttattgtgc gtaactaact 6840  
tgccatcttc aaacaggagg gctggaagaa gcagaccgct aacacagtac ataaaaaagg 6900  
agacatgaac gatgaacatc aaaaagtttg caaaacaagc aacagtatta acctttacta 6960  
ccgcactgct ggcaggaggc gcaactcaag cgtttgcgaa agaaacgaac caaaagccat 7020  
ataaggaaac atacggcatt tcccatatta cacgccatga tatgctgcaa atccctgaac 7080  
agcaaaaaaa tgaaaaatat caagttcctg aatttgattc gtccacaatt aaaaatatct 7140  
cttctgcaaa aggcctggac gtttgggaca gctggccatt acaaaacgct gacggcactg 7200  
tcgcaaacta tcacggctac cacatcgtct ttgcattagc cggagatcct aaaaatgcgg 7260  
atgacacatc gatttacatg ttctatcaaa aagtcggcga aacttctatt gacagctgga 7320  
aaaacgctgg ccgcgtcttt aaagacagcg acaaattcga tgcaaatgat tctatcctaa 7380  
aagaccaaac acaagaatgg tcaggttcag ccacatttac atctgacgga aaaatccgtt 7440  
tattctacac tgatttctcc ggtaaacatt acggcaaaca aacactgaca actgcacaag 7500  
ttaacgtatc agcatcagac agctctttga acatcaacgg tgtagaggat tataaatcaa 7560  
tctttgacgg tgacggaaaa acgtatcaaa atgtacagca gttcatcgat gaaggcaact 7620  
acagctcagg cgacaaccat acgctgagag atcctcacta cgtagaagat aaaggccaca 7680  
aatacttagt atttgaagca aacactggaa ctgaagatgg ctaccaaggc gaagaatctt 7740  
tatttaacaa agcatactat ggcaaaagca catcattctt ccgtcaagaa agtcaaaaac 7800  
ttctgcaaag cgataaaaaa cgcacggctg agttagcaaa cggcgctctc ggtatgattg 7860  
agctaaacga tgattacaca ctgaaaaaag tgatgaaacc gctgattgca tctaacacag 7920  
taacagatga aattgaacgc gcgaacgtct ttaaaatgaa cggcaaattg tacctgttca 7980  
ctgactcccg cggatcaaaa atgacgattg acggcattac gtctaacgat atttacatgc 8040  
ttggttatgt ttctaattct ttaactggcc catacaagcc gctgaacaaa actggccttg 8100  
tgttaaaaat ggatcttgat cctaacgatg taacctttac ttactcacac ttcgctgtac 8160  
ctcaagcgaa aggaacaat gtcgtgatta caagctatat gacaaacaga ggattctacg 8220  
cagacaaaca atcaacgttt gcgccgagct tcctgctgaa catcaaaggc aagaaaacat 8280  
ctgttggtcaa agacagcatc cttgaacaag gacaattaac agtt 8324

<211> 52  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> SEQ\_ID\_23

<400> 23  
cccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

<210> 24  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> SEQ\_ID\_24

<400> 24  
tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

<210> 25  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> SEQ\_ID\_25

<400> 25  
gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

<210> 26  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> SEQ\_ID\_26

<400> 26  
gagagggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

<210> 27  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> SEQ\_ID\_27

<400> 27  
gagagggcgcg ccgcgcaaag tcccgttcg tgaa 34

<210> 28  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_28

&lt;400&gt; 28

gagagggcgg ccgctcaagt.cgggtcaagcc acgc

34

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_29

&lt;400&gt; 29

tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt 60

tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc 120

tctagaccgg ggatttaaatt . 140

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_30

&lt;400&gt; 30

gatcatttaa atcccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60

tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc 120

aggcctctcg agatttaaatt . 140

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 5091

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCLIK5MCS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (469 )..(1260 )

&lt;223&gt; KanR

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1527 )..(2387 )

&lt;223&gt; Ori EC pMB (complement)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2533 )..(3207 )

&lt;223&gt; Orf1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

<222> (3541)..(4662)

<223> Rep Protein

<400> 31

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag cacgcgtcat atgactagtt 60  
cggacctagg gatatcgtag acatcgatgc tcttctgcgt taattaacaa ttgggaccc 120  
ctagacccgg gatttaaatc gctagcgggc tgctaaagga agcggaacac gtagaaagcc 180  
agtccgcaga aacgggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg 240  
gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgcagtg ggcttacatg gcgataagcta 300  
gactgggagg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt 360  
aagggtggga agccctgcaa agtaaactgg atggctttct tgccgccaag gatctgatgg 420  
cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa 480  
gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 540  
gcacaacaga caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggagc 600  
ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca 660  
gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct 720  
actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca 780  
tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat 840  
acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 900  
cgtactcgga tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 960  
ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc 1020  
gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaatatgg ccgcttttct 1080  
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct 1140  
accgctgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac 1200  
ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 1260  
tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag 1320  
atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt ttccgggagc 1380  
ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1440  
gcgcgccggc cggcccggtg tgaaataacc cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac 1500  
aggcgtcttt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 1560  
gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620  
ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 1680  
ctggcgtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt 1740  
cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc 1800

ctcgtgcgct ctectgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860  
tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920  
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcccta 1980  
tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040  
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100  
tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 2160  
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac caccgctggt 2220  
agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgcg gaaaaaagg atctcaagaa 2280  
gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc acgttaaggg 2340  
attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ggccggccgc 2400  
ggccgcgcaa agtcccgtt cgtgaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact 2460  
ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgtcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc 2520  
gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580  
gtcgatttaa aaacggtgat cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca 2640  
tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgac ctagaaactc tcgtggcgga tcttgaggag 2700  
ctggctgacg agctgcgtgc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760  
atcagttgcg cctactgcgg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgcg aggacggcg 2820  
gcaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcg caacaaacgc 2880  
cacgccgagg agctggaggc ggctaggtcg caaatggcg tggaagtgcg tccccgagc 2940  
gaaattttg ccatggtcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg 3000  
gcggtgcccg caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttcgtgtgcc gtggccgccc 3060  
aggacgtgtc agcgccgcca ccacctgcac cgaatcggca gcagcgtcgc gcgtcgaaaa 3120  
agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180  
gtgagcggta actcacaggg cgtcggctaa cccccagtcc aaacctggga gaaagcgctc 3240  
aaaaatgact ctagcggatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga 3300  
tctgttcgac acccatcccg agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcgaagaccg 3360  
ccgcgaattc ctcgctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420  
cgccagcgct tggatcaaag acccggacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt 3480  
ggttcaaaat cgcttgcccg gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgc gcacgcagcc 3540  
gtgcttgctc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaat cgagcacgta 3600  
aaccgccagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttgg 3660  
atcggcgtga atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720

gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgcctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780  
acccgcgttt tcggcgctga ccaggctttt tcacataggc tgagccgtgg ccaactgcact 3840  
ctccgacgat cccagccgta ccgctggcat gccagacaca atcgcggtga tcgcctagct 3900  
gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaa aacctaaaaa acgctatgag 3960  
caggagtttt ctagcggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca 4020  
aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcgccg ctgaagcgtc tggagagctg 4080  
atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccaggggcgtg ccgcccgtga tgagacggct 4140  
tttcgccacg ctttgactgt gggataccag ttaaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac 4200  
accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggt cggaggaggc 4260  
cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgcg acgtgtgcgc 4320  
ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380  
ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440  
tggaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaactagc taagtccagt 4500  
caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcaggttg gtttatgact 4560  
gttgagggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620  
tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cagaggacg 4680  
ccgaaagctt cccagtaa at gtgccatctc gtaggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740  
tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgctctt gaagctctct aggggggctc 4800  
acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctgcctcgt aagcgcacaa ggactgctcc 4860  
caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcgaa gccttgcccc gcggaaattt 4920  
cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980  
tggtattctta ccgtggaaat tcttcgcaaa aatcgtcccc tgatcgccct tgcgacgttg 5040  
gcgtcgggtg cgctgggtgc gcttggcttg accgacttga tcagcggccg c 5091

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_32

&lt;400&gt; 32

gcgcggtacc tagactcacc ccagtgc

28

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>  
<223> SEQ\_ID\_33

<400> 33  
ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt

30

<210> 34  
<211> 6349  
<212> DNA  
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<223> PCLIK5MCS

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (42 )..(177 )  
<223> PmetA

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (178 )..(1311 )  
<223> metA

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1727 )..(2518 )  
<223> KanR

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2785 )..(3645 )  
<223> Orf1

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3791 )..(4465 )  
<223> Ori-EC complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4799 )..(5920 )  
<223> Rep Protein

<400> 34  
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag ctagactcac cccagtgttt 60  
aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 120  
tccatataca ctggacgaag ttttagtctt gtccaccag aacaggcgggt tattttcatg 180  
cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccaccgaa 240  
gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctgggggtga ataccgcgta 300  
gataaagaag gacgcagcaa tgctgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 360  
gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggg cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac 420  
tgctgtgatct gtaccaacgt catcgggtgg tgcaacgggt ccaccggacc tggctccatg 480  
catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc ttccccgcca cgtccattcg tgatcaggta 540

aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcacaccca cggtcgccgc agtacttggt 600  
ggttccatgg gtggtgcccg caccctagag tgggccgcaa tgtaccaga aactgttggc 660  
gcagctgctg ttcttgcaat ttctgcacgc gccagcgcct ggcaaatcgg cattcaatcc 720  
gcccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 780  
ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgcccacct cacctaccgt 840  
ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaaccactc 900  
ggtccctacc gcaagcccga ccagcgcttc gccgtggaat cctacttgga ctaccaagca 960  
gacaagctag tacagcgttt cgacgcgggc tcctacgtct tgctcaccga cgccctcaac 1020  
cgccacgaca ttggtcgca cgcggaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080  
ccagtccttg tcgcaggcgt agataccgat attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140  
ctctccagaa acctgggaaa tctactggca atggcaaaaa tcgtatcccc tgctggccac 1200  
gatgctttcc tcaccgaaag ccgccaaatg gatcgcatcg tgaggaaact cttcagcctc 1260  
atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgagt tctacatcta aactagtctg 1320  
gacctaggga tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct 1380  
agaccggga tttaaatacg tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag 1440  
tccgcagaaa cggtgctgac cccgatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga 1500  
aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560  
ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1620  
ggttgggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg 1680  
caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga 1740  
tggaattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 1800  
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttcggg ctgtcagcgc aggggcgccc 1860  
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920  
gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac 1980  
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcg gggcaggatc tcctgtcatc 2040  
tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2100  
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg 2160  
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2220  
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 2280  
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg 2340  
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2400  
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 2460

tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2520  
agcgggactc tgggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2580  
ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2640  
ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc cgctagcggc 2700  
gcgccggccg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 2760  
gcgctcttcc gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 2820  
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2880  
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 2940  
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3000  
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3060  
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3120  
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg ttaggtcgt 3180  
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata 3240  
cgtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3300  
cactggtaac aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagt 3360  
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 3420  
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3480  
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 3540  
tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gttaagggat 3600  
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaagg ccggccgcgg 3660  
ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt 3720  
aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 3780  
atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt 3840  
cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 3900  
acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggtatc ttgaggagct 3960  
ggctgacgag ctgcgtgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4020  
cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag gacggcgcg 4080  
aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4140  
cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4200  
aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4260  
ggtgcccga ggcattgaaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag 4320  
gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4380

cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt 4440  
gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgctcaa 4500  
aatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgac 4560  
tggtcgacac ccatcccagag ctgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4620  
gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4680  
ccagcgcttg gatcaaagac ccggacacgg agaacacag ccgaagtatt accgagttgg 4740  
ttcaaaatcg cttgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 4800  
gcttgctctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860  
ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcg cagcttggat 4920  
cggcgatgaat ccactgagcg ggaaatgcc gctcatctgg ctcatgac cgggtgatgc 4980  
cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040  
ccgcgttttc ggcgctgacc aggttttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100  
ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160  
tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220  
ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa 5280  
agcacttgcc acgcttgaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5340  
cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgctcc agggcgctgc gcccgatg agacggcttt 5400  
tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5460  
caagggatcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg 5520  
tgagcctgat ctgccgccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5580  
ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5640  
gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg 5700  
gaaagaccca aacagtgagt acgcccagac acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760  
acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt 5820  
tgaggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880  
acgtcagac gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940  
gaaagcttcc cagtaaattg gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggtctc 6000  
tctcttgcc tcctttctag gtcgggctga ttgctctga agctctctag gggggctcac 6060  
accataggca gataacgttc ccacccggct cgcctcgtaa gcgcacaagg actgctcca 6120  
aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttcgcgaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180  
tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcc agcttctttc accctaaatt cgagagattg 6240  
gattcttacc gtggaaattc ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgccctg cgacgttggc 6300

gtcgggtgccg ctgggtgcgc ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc

6349

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_35

&lt;400&gt; 35

gagactcgag agctgccaat tattccggg

29

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_36

&lt;400&gt; 36

cctgaaggcg cgaggggtggg catgggtaaa aaatcctttc g

41

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_37

&lt;400&gt; 37

cccaccctcg cgccttcag

19

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SEQ\_ID\_38

&lt;400&gt; 38

ctgggtacat tgcggccc

18

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 6386

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; PCLIK5MCS

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (6 )..(196 )

&lt;223&gt; Psod

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (197)..(1330 )  
<223> metA

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1752)..(2543 )  
<223> KanR

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2810)..(3670 )  
<223> Ori-Ec (pMB) complement

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3816)..(4490 )  
<223> Orf1

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (4824)..(5945 )  
<223> Rep Protein

<400> 39  
tcgagagctg ccaattattc cgggcttggtg acccgctacc cgataaatag gtcggctgaa 60  
aaatttcgtt gcaatatcaa caaaaaggcc tatcattggg aggtgtcgca ccaagtactt 120  
ttgcgaagcg ccatctgacg gattttc<sup>1</sup>aaa agatgtatat gtcgggtg<sup>2</sup>cg gaaacctacg 180  
aaaggatttt ttacccatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat 240  
cggatgatgtc tccaccgaag cgggagcaat cattacaaac gctgaaatcg cctatcaccg 300  
ctgggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat gtcgttctca tcgaacacgc 360  
cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac ttgctcggtc ccggcaaagc 420  
catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc atcggtggtt gcaacggttc 480  
caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaatttctgg ggtaatcgct tccccgccac 540  
gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc gacgcactcg gcatcaccac 600  
ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tggtgcccgc accctagagt gggccgcaat 660  
gtacccagaa actggttggcg cagctgctgt tcttg<sup>3</sup>cagtt tctgcacgcg ccagcgcctg 720  
gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa aacgaccacc actggcacga 780  
aggcaactac tacgaatccg gctgcaacc<sup>4</sup> agccaccgga ctcggcgcg cccgacgcat 840  
cgcccacctc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa cgcttcggca ccaaagccca 900  
aaagaacgaa aaccactcg gtccctaccg caagccc<sup>5</sup>gac cagcgcttcg ccgtggaatc 960  
ctacttg<sup>6</sup>gac taccaagcag acaagctagt acagcgtttc gacgccggct cctacgtctt 1020  
gtcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgcgac cgcggaggcc tcaacaaggc 1080  
actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgcaggcgta gataccgata ttttgtaccc 1140

ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat ctactggcaa tggcaaaaat 1200  
cgtatcccct gtcggccacg atgctttcct caccgaaagc cgccaaatgg atcgcatcgt 1260  
gaggaacttc ttcagcctca tctccccaga cgaagacaac ccttcgacct acatcgagtt 1320  
ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg 1380  
cgtaaattaa caattgggat cctctagacc cgggatttaa atcgctagcg ggctgctaaa 1440  
ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacgggtg ctgaccccg atgaatgtca 1500  
gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa gagaaagcag gtagcttgca 1560  
gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat 1620  
tgccagctgg ggcgcctctt ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt 1680  
tcttgccgcc aaggatctga tggcgaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag 1740  
gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg 1800  
agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt 1860  
tccggctgtc agcgagggg cgcccggttc tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgcc 1920  
tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt 1980  
gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag 2040  
tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg 2100  
ctgatgcaat gcggcggtg catacgttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag 2160  
cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg 2220  
atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc 2280  
gcatgcccga cggcgaggat ctgctcgtga cccatggcga tgccctgctt ccgaatatca 2340  
tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc 2400  
gctatcagga catagcgtt gctaccctg atattgctga agagcttggc ggccaatggg 2460  
ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgtccccga ttcgcagcgc atcgcttct 2520  
atcgcttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc 2580  
gacgccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaagggtggg 2640  
cttcggaatc gttttccggg acgcccgtg gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct 2700  
ggagttcttc gccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccc gtgtgaaata ccgcacagat 2760  
gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc ctgctcact gactcgctgc 2820  
gctcggctgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 2880  
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 2940  
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc 3000  
atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 3060

aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 3120  
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 3180  
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg 3240  
ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagac 3300  
acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 3360  
gcggtgctac agagtcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 3420  
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat 3480  
ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 3540  
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt 3600  
ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 3660  
agatcctttt aaaggccggc cgcgcccgcg caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc 3720  
cgcggtgattt tccgccaaaa actttaacga acgttcgtta taatgggtgc atgaccttca 3780  
cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga tctctctgat gtcgcgctgg 3840  
agtcgcagcg gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggg gatcggattt ttccgagctc 3900  
tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag actgggccag tgccgcgagc gacctagaaa 3960  
ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg tgctcggcca gcgccaggag 4020  
gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg cgggtggcctg attcctcccc 4080  
ggcctgaccc gcgaggacgg cgcgcaaaat attgctcaga tgcgtgtcgt gccgcagcca 4140  
gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccc aggagctgga ggcggctagg tcgcaaatgg 4200  
cgctggaagt gcgtcccccg agcgaaattt tggccatggg cgtcacagag ctggaagcgg 4260  
cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgccg 4320  
cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg ccaccacctg caccgaatcg 4380  
gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag aagcgataag ctgcacgaat 4440  
acctgaaaaa tggtgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca ggcgctcggc taacccccag 4500  
tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg attcacgaga cattgacaca 4560  
ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacaccatc ccgagctcgc gctgcgatca 4620  
cgtggctgga cgagcgaaga ccgcccga ttcctcgtc acctgggcag agaaaatttc 4680  
cagggcagca agaccgcga cttcgccagc gcttgatca aagaccgga cacggagaaa 4740  
cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc ccggtgccag tatgttgctc 4800  
tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat tgatgtgccg agccaccagg 4860  
ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccctg aggtctacgc gattttggag cgctgggcac 4920  
gcctggaaaa agcgcagct tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaa tgccagctca 4980

tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc 5040  
tggtgcaac gaccgaggaa atgaccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata 5100  
ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc 5160  
acaatcgctg ggatcgcta gctgatctta tggaggttgc tcgcatgac tcaggcacag 5220  
aaaaaccta aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg 5280  
caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg 5340  
ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt cctctggact gctccagggc 5400  
gtgccgcccg tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac tgtgggatac cagttaaaag 5460  
cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcacgagc ctacgagcgt gcctacaccg 5520  
tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga 5580  
cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc 5640  
gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg 5700  
gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc 5760  
gagaaaaact agctaagtcc agtcaacgac aagctaggaa agctaaagga aatcgcttga 5820  
ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg gagagactgg ctctgggccg acaatcaatg 5880  
aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcacct aaggtctgcg 5940  
ggcattgaac ttccacgagg acgccgaaag cttcccagta aatgtgccat ctctaggca 6000  
gaaaacggtt ccccgtagg gtctctctct tggcctcctt tctaggtcgg gctgattgct 6060  
cttgaagctc tctagggggg ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcct 6120  
cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgccgca ctgccttcgc 6180  
gaagccttgc cccgcggaaa tttcctccac cgagttcgtg cacacccta tgccaagctt 6240  
ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga aattcttcgc aaaaatcgtc 6300  
ccctgatcgc cttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggt tgcgcttggc ttgaccgact 6360  
tgatcagcgg ccgctcgatt taaatc 6386

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 1005

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE

&lt;400&gt; 40

atgaaccta agaaccccga aacgccagac cgtaaccttg ctatggagct ggtgcgagtt 60

acggaagcag ctgcactggc ttctggacgt tgggttgac gtggcatgaa gaatgaaggc 120

gacggtgccg ctgttgacgc catgcgccag ctcataact cagtgacct gaaggcgctc 180

gttgttatcg gcgagggcga aaaagacgaa gctccaatgc tgtacaacgg cgaagaggtc 240  
 ggaaccggct ttggacctga gggtgatatc gcagttgacc cagttgacgg caccaccctg 300  
 atggctgagg gtcgccccaa cgcaatttcc attctcgag ctgcagagcg tggcaccatg 360  
 tacgatccat cctccgtctt ctacatgaag aagatcgccg tgggacctga ggccgcaggc 420  
 aagatcgaca tcgaagctcc agttgcccac aacatcaacg cgggtggcaaa gtccaaggga 480  
 atcaaccctt ccgacgtcac cgttgctgtg cttgaccgtc ctgcccacat cgaactgatc 540  
 gcagacattc gtcgtgcagg cgcaaagggt cgtctcatct ccgacggcga cgttgacagg 600  
 gcagttgcag cagctcagga ttccaactcc gtggacatca tgatgggcac cggcggaacc 660  
 ccagaaggca tcatcactgc gtgcgccatg aagtgcattg gtggcgaaat ccagggcata 720  
 ctggccccaa tgaacgattt cgagcgccag aaggcacacg acgctggctt ggttcttgat 780  
 caggttctgc acaccaacga tctggtgagc tccgacaact gctacttcgt ggcaaccggg 840  
 gtgaccaacg gtgacatgct ccgtggcggt tctaccgcg caaacggcgc aaccaccgtg 900  
 tccctgggta tgcgcgcaaa gtcaggcacc atccgccaca tcgagtctgt ccaccagctg 960  
 tccaagctgc aggaatactc cgtgggtgac tacaccaccg cgacc 1005

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 335

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;400&gt; 41

Met Asn Leu Lys Asn Pro Glu Thr Pro Asp Arg Asn Leu Ala Met Glu  
 1 5 10 15

Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala Ala Leu Ala Ser Gly Arg Trp Val  
 20 25 30

Gly Arg Gly Met Lys Asn Glu Gly Asp Gly Ala Ala Val Asp Ala Met  
 35 40 45

Arg Gln Leu Ile Asn Ser Val Thr Met Lys Gly Val Val Val Ile Gly  
 50 55 60

Glu Gly Glu Lys Asp Glu Ala Pro Met Leu Tyr Asn Gly Glu Glu Val  
 65 70 75 80

Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile Ala Val Asp Pro Val Asp  
 85 90 95

Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro Asn Ala Ile Ser Ile Leu  
 100 105 110

Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp Pro Ser Ser Val Phe Tyr  
 115 120 125

Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala Ala Gly Lys Ile Asp Ile  
 130 135 140

Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala Val Ala Lys Ser Lys Gly

## 41

145						150						155						160
Ile	Asn	Pro	Ser	Asp	Val	Thr	Val	Val	Val	Leu	Asp	Arg	Pro	Arg	His			
				165					170					175				
Ile	Glu	Leu	Ile	Ala	Asp	Ile	Arg	Arg	Ala	Gly	Ala	Lys	Val	Arg	Leu			
			180					185					190					
Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Asp	Ser			
		195					200					205						
Asn	Ser	Val	Asp	Ile	Met	Met	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Pro	Glu	Gly	Ile			
	210					215					220							
Ile	Thr	Ala	Cys	Ala	Met	Lys	Cys	Met	Gly	Gly	Glu	Ile	Gln	Gly	Ile			
225					230					235					240			
Leu	Ala	Pro	Met	Asn	Asp	Phe	Glu	Arg	Gln	Lys	Ala	His	Asp	Ala	Gly			
				245					250					255				
Leu	Val	Leu	Asp	Gln	Val	Leu	His	Thr	Asn	Asp	Leu	Val	Ser	Ser	Asp			
			260					265					270					
Asn	Cys	Tyr	Phe	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Thr	Asn	Gly	Asp	Met	Leu	Arg			
		275					280					285						
Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Ala	Asn	Gly	Ala	Thr	Thr	Arg	Ser	Leu	Val	Met			
	290					295					300							
Arg	Ala	Lys	Ser	Gly	Thr	Ile	Arg	His	Ile	Glu	Ser	Val	His	Gln	Leu			
305					310					315					320			
Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Tyr	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Thr	Thr	Ala	Thr				
				325					330					335				

```
<210> 42
<211> 6
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
```

<220>  
<223> POTENTIELLE -10-REGION 1

<400> 42  
tqcaat

6

```
<210> 43
<211> 7
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
```

<220>  
<223> POTENTIELLE -10-REGION 2

<400> 43  
tatcatt

7

```
<210> 44
<211> 7
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum
```

<220>

<223> RIBOSOMALE\_BINDUNGSSTELLE\SHINE-DALGARNO

<400> 44

gaaagga

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
T/EP2004/014337

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/77 C12N9/02 C12N1/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MERKAMM MURIEL ET AL: "Cloning of the sodA gene from Corynebacterium melassecola and role of superoxide dismutase in cellular viability" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 183, no. 4, February 2001 (2001-02), pages 1284-1295, XP002320454 ISSN: 0021-9193	1-17,20, 24-35, 49-54
Y	page 1277, right-hand column, paragraph 2; figure 3  page 1292, left-hand column, paragraphs 1,2  <div style="text-align: center;">-/--</div>	18,19, 21-23, 36-48
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
* Special categories of cited documents :		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*&amp;* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center;">8 March 2005</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center;">01/04/2005</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center;">Rutz, B</div>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2004/014337

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>-&amp; DATABASE EMBL 'Online! 7 February 2001 (2001-02-07), "Corynebacterium melassecola peptide methionine sulfoxide reductase A (msrA) and manganese superoxide dismutase (sodA) genes, complete cds." XP002320456 retrieved from EBI accession no. EM_PRO:AF236111 Database accession no. AF236111 -----</p> <p>WO 01/00804 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 4 January 2001 (2001-01-04)</p> <p>page 6, line 5 - line 13 page 37, line 1 - page 45, line 9 page 56; table 1</p> <p>-&amp; DATABASE Geneseq 'Online! 30 April 2001 (2001-04-30), "C. glutamicum SRT protein nucleotide sequence SEQ ID NO:15." XP002320457 retrieved from EBI accession no. GSN:AAF70991 Database accession no. AAF70991 -----</p>	18,19, 21-23, 36-48
A	<p>EP 1 108 790 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 20 June 2001 (2001-06-20) -&amp; DATABASE Geneseq 'Online! 26 September 2001 (2001-09-26), "C glutamicum coding sequence fragment SEQ ID NO: 7069." XP002320458 retrieved from EBI accession no. GSN:AAH68534 Database accession no. AAH68534 -----</p>	
A	<p>DATABASE EMBL 'Online! 2 August 2001 (2001-08-02), "Corynebacterium glutamicum gene for superoxide dismutase, complete cds." XP002320459 retrieved from EBI accession no. EM_PRO:AB055218 Database accession no. AB055218 -----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/014337

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATEK M ET AL: "PROMOTERS FROM CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM: CLONING, MOLECULAR ANALYSIS AND SEARCH FOR A CONSENSUS MOTIF" MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, vol. 142, no. 5, 1996, pages 1297-1309, XP008006983 ISSN: 1350-0872 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>REINSCHIED DIETER J ET AL: "Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the Corynebacterium glutamicum pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase" MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, vol. 145, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 503-513, XP002211213 ISSN: 1350-0872 cited in the application</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	
A	<p>HASSETT DANIEL J ET AL: "Cloning and characterization of the Pseudomonas aeruginosa sodA and sodB genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: Demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 175, no. 23, 1993, pages 7658-7665, XP002320455 ISSN: 0021-9193</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/014337

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0100804	A	04-01-2001	AU 5836900 A	31-01-2001
			BR 0011811 A	18-06-2002
			CA 2380870 A1	04-01-2001
			CN 1451047 A	22-10-2003
			EP 1290178 A2	12-03-2003
			ES 2184658 T1	16-04-2003
			HU 0203340 A2	28-01-2003
			WO 0100804 A2	04-01-2001
			JP 2003525593 T	02-09-2003
			MX PA01012844 A	09-07-2002
			PL 359863 A1	06-09-2004
			SK 18882001 A3	10-09-2002
			TR 200103709 T2	21-08-2002
			US 6822084 B1	23-11-2004
			AU 5421300 A	31-01-2001
			CA 2383865 A1	04-01-2001
			EP 1257649 A2	20-11-2002
			ES 2177475 T1	16-12-2002
			WO 0100843 A2	04-01-2001
			JP 2004534501 T	18-11-2004
			MX PA01013123 A	21-06-2002
			PL 353541 A1	01-12-2003
			SK 18862001 A3	06-11-2002
			TR 200103707 T2	23-09-2002
			AU 5559000 A	31-01-2001
			BR 0011805 A	14-05-2002
			CA 2383875 A1	04-01-2001
			CN 1370235 A	18-09-2002
			CZ 20014659 A3	11-09-2002
			EP 1263963 A2	11-12-2002
			WO 0100844 A2	04-01-2001
			JP 2003517291 T	27-05-2003
			MX PA01012842 A	09-07-2002
			PL 353388 A1	17-11-2003
			SK 18872001 A3	03-12-2002
			TR 200103706 T2	21-10-2002
			US 2004180408 A1	16-09-2004
			AU 5421600 A	31-01-2001
			CA 2380863 A1	04-01-2001
			CZ 20014660 A3	11-09-2002
			EP 1255839 A2	13-11-2002
			ES 2177476 T1	16-12-2002
			ES 2178979 T1	16-01-2003
			WO 0100805 A2	04-01-2001
			JP 2004513603 T	13-05-2004
			MX PA01012845 A	09-07-2002
			PL 359967 A1	06-09-2004
			SK 18912001 A3	08-10-2002
			TR 200103708 T2	21-08-2002
			US 6696561 B1	24-02-2004
EP 1108790	A	20-06-2001	EP 1108790 A2	20-06-2001
			JP 2002191370 A	09-07-2002
			US 2002197605 A1	26-12-2002

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014337

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/77 C12N9/02 C12N1/21

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MERKAMM MURIEL ET AL: "Cloning of the sodA gene from Corynebacterium melassecola and role of superoxide dismutase in cellular viability" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 183, Nr. 4, Februar 2001 (2001-02), Seiten 1284-1295, XP002320454 ISSN: 0021-9193	1-17, 20, 24-35, 49-54
Y	Seite 1277, rechte Spalte, Absatz 2; Abbildung 3  Seite 1292, linke Spalte, Absätze 1,2 -/--	18, 19, 21-23, 36-48

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. März 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/04/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rutz, B

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014337

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
	<p>-&amp; DATABASE EMBL 'Online! 7. Februar 2001 (2001-02-07), "Corynebacterium melassecola peptide methionine sulfoxide reductase A (msrA) and manganese superoxide dismutase (sodA) genes, complete cds." XP002320456 gefunden im EBI accession no. EM_PRO:AF236111 Database accession no. AF236111 -----</p>	
Y	<p>WO 01/00804 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) 4. Januar 2001 (2001-01-04)  Seite 6, Zeile 5 - Zeile 13 Seite 37, Zeile 1 - Seite 45, Zeile 9 Seite 56; Tabelle 1 -&amp; DATABASE Geneseq 'Online! 30. April 2001 (2001-04-30), "C. glutamicum SRT protein nucleotide sequence SEQ ID NO:15." XP002320457 gefunden im EBI accession no. GSN:AAF70991 Database accession no. AAF70991 -----</p>	18, 19, 21-23, 36-48
A	<p>EP 1 108 790 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD) 20. Juni 2001 (2001-06-20) -&amp; DATABASE Geneseq 'Online! 26. September 2001 (2001-09-26), "C glutamicum coding sequence fragment SEQ ID NO: 7069." XP002320458 gefunden im EBI accession no. GSN:AAH68534 Database accession no. AAH68534 -----</p>	
A	<p>DATABASE EMBL 'Online! 2. August 2001 (2001-08-02), "Corynebacterium glutamicum gene for superoxide dismutase, complete cds." XP002320459 gefunden im EBI accession no. EM_PRO:AB055218 Database accession no. AB055218 -----</p>	
A	<p>PATEK M ET AL: "PROMOTERS FROM CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM: CLONING, MOLECULAR ANALYSIS AND SEARCH FOR A CONSENSUS MOTIF" MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, Bd. 142, Nr. 5, 1996, Seiten 1297-1309, XP008006983 ISSN: 1350-0872 in der Anmeldung erwähnt -----</p>	
	-/--	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014337

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>REINSCHIED DIETER J ET AL: "Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the Corynebacterium glutamicum pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase" MICROBIOLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, READING, GB, Bd. 145, Nr. 2, Februar 1999 (1999-02), Seiten 503-513, XP002211213 ISSN: 1350-0872 in der Anmeldung erwähnt</p> <p>-----</p>	
A	<p>HASSETT DANIEL J ET AL: "Cloning and characterization of the Pseudomonas aeruginosa sodA and sodB genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: Demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 175, Nr. 23, 1993, Seiten 7658-7665, XP002320455 ISSN: 0021-9193</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014337

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0100804	A	04-01-2001	AU 5836900 A	31-01-2001
			BR 0011811 A	18-06-2002
			CA 2380870 A1	04-01-2001
			CN 1451047 A	22-10-2003
			EP 1290178 A2	12-03-2003
			ES 2184658 T1	16-04-2003
			HU 0203340 A2	28-01-2003
			WO 0100804 A2	04-01-2001
			JP 2003525593 T	02-09-2003
			MX PA01012844 A	09-07-2002
			PL 359863 A1	06-09-2004
			SK 18882001 A3	10-09-2002
			TR 200103709 T2	21-08-2002
			US 6822084 B1	23-11-2004
			AU 5421300 A	31-01-2001
			CA 2383865 A1	04-01-2001
			EP 1257649 A2	20-11-2002
			ES 2177475 T1	16-12-2002
			WO 0100843 A2	04-01-2001
			JP 2004534501 T	18-11-2004
			MX PA01013123 A	21-06-2002
			PL 353541 A1	01-12-2003
			SK 18862001 A3	06-11-2002
			TR 200103707 T2	23-09-2002
			AU 5559000 A	31-01-2001
			BR 0011805 A	14-05-2002
			CA 2383875 A1	04-01-2001
			CN 1370235 A	18-09-2002
			CZ 20014659 A3	11-09-2002
			EP 1263963 A2	11-12-2002
			WO 0100844 A2	04-01-2001
			JP 2003517291 T	27-05-2003
			MX PA01012842 A	09-07-2002
			PL 353388 A1	17-11-2003
			SK 18872001 A3	03-12-2002
			TR 200103706 T2	21-10-2002
			US 2004180408 A1	16-09-2004
			AU 5421600 A	31-01-2001
			CA 2380863 A1	04-01-2001
			CZ 20014660 A3	11-09-2002
			EP 1255839 A2	13-11-2002
			ES 2177476 T1	16-12-2002
			ES 2178979 T1	16-01-2003
			WO 0100805 A2	04-01-2001
			JP 2004513603 T	13-05-2004
			MX PA01012845 A	09-07-2002
			PL 359967 A1	06-09-2004
			SK 18912001 A3	08-10-2002
			TR 200103708 T2	21-08-2002
			US 6696561 B1	24-02-2004
<hr/>				
EP 1108790	A	20-06-2001	EP 1108790 A2	20-06-2001
			JP 2002191370 A	09-07-2002
			US 2002197605 A1	26-12-2002
<hr/>				